

Pathohistologische und zytogenetische Auswertung der Nierentumorbiopsie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-
Universität Jena

von Al Mohannad Al Mustafa
geb. am 16.09.1966 in Syrien

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
Abb.	Abbildung
AE-Buffer	Elution buffer
AL	Lysis buffer
ATL	Tissue Lysis buffer
AW-Buffer	Wash buffer
BSA	bovine serum albumin
Bzw.	beziehungsweise
CGH	Comperative Genomic Hybridization
CT	Computertomographie
DAPI	4,6-Diamino-2phenylindol
DNA	Desoxyribonucleid Acid
DOP	Degenerate Oligonucleotide Primer
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
G	Grading, Malignitätsgrad
HE	Hämatoxillin-Eosin
KZ	klarzellig
M	Fernmetastasen
MRT	Magnetresonanztomographie
NZK	Nierenzellkarzinom
N	Lymphknoten
OT	Objekträger
PCR	Primer Chain Reaktion
RNA	Ribonucleic Acid
T	Tumorausdehnung
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
SSC	Solution sodium Citrate
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VHL	Von-Hippel-Lindau-Syndrom
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis	2
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1. Klinische Bedeutung des Nierenzellkarzinoms	8
2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	8
2.1.2. Symptomatik und rationale Diagnostik	9
2.2. Klinische und pathomorphologische Grundlagen	
der Nierentumorklassifikation	13
2.2.1. Malignitätsgrad	16
2.2.2. pTNM-Klassifikation der UICC (2002)	17
2.3. Genetische Merkmale der Nierenzellkarzinome	18
2.3.1. Klarzellige Nierenzellkarzinome	19
2.3.2. Papilläre Nierenzellkarzinome	20
2.3.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome	20
2.3.4. Sammelrohrkarzinome (Bellini-Duct-Karzinome)	20
2.3.5. Nicht klassifizierbare Nierenzellkarzinome	20
2.3.6. Metanephrogene Adenome	21
2.3.7. Nierenonkozytome	21
3. Zielstellung	23
4. Materialien und Methoden	25
4.1. Materialgewinnung	26
4.2. Comparative Genomic Hybridization- CGH	27
4.2.1. DNA-Isolation	27
4.2.2. DOP-PCR: (Degenerate Oligonucleotide Primer Chain Reaction)	28
4.2.3. DNA-Markierung	31
4.2.4. Hybridisierung	32
4.2.5. Detektion	33
4.2.6. Verstärkung	35

4.2.7. Auswertung, Dokumentation	36
5. Ergebnisse	40
5.1. Pathohistologische Ergebnisse der Nierentumoren am Operationspräparat	40
5.1.1. Klarzellige Nierenzellkarzinome	40
5.1.2. Chromophile Nierenzellkarzinome	41
5.1.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome	41
5.1.4. Onkozytome	42
5.2. Pathohistologische Ergebnisse der Nierentumorbiopsie	43
5.3. Genetische Ergebnisse	47
5.3.1. Häufigkeit einzelner Chromosomenaberrationen	48
5.3.2. Chromosomenaberrationen bei unterschiedlichen Zelltypen	49
5.3.2.1 Klarzellige Nierenzellkarzinome	49
5.3.2.2. Chromophile Nierenzellkarzinome	50
5.3.2.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome	51
5.3.2.4. Onkozytome	52
5.3.3. Differenzierung der Chromosomenaberrationen nach Malignitätsgrad	57
5.4. Vergleich der pathohistologischen Ergebnisse der Nierentumoren mit den pathohistologischen Ergebnissen der Nierentumorbiopsien	57
5.5. Vergleich der pathohistologischen Ergebnisse der Nierentumoren mit den genetischen Ergebnissen der Nierentumorbiopsien	58
6. Diskussion	60
6.1. Pathohistologische Ergebnisse der Nierentumorbiopsien	61
6.2. Genetische Ergebnisse	63
6.2.1. Chromosomenaberrationen bei unterschiedlichen Zelltypen	64
6.2.1.1. Klarzellige Nierenzellkarzinome	64
6.2.1.2. Chromophile Nierenzellkarzinome	65
6.2.1.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome	66
6.2.1.4. Onkozytome	66

6.2.2. Differenzierung der Chromosomenaberrationen nach Malignitätsgrad	67
7. Schlussfolgerungen	68
8. Literaturverzeichnis	70
9. Anhang	78
I- Tabellen	78
II- Lebenslauf	86
III- Danksagung	87
IV- Ehrenwörtliche Erklärung	88

1. Zusammenfassung

Die Nierentumorbiopsie ist ein schnelles, sicheres und genaues Diagnoseverfahren. Die pathohistologische Charakterisierung der renalen Raumforderungen mittels Feinnadelbiopsie ist abhängig von der Tumorgröße und der Anzahl der Biopsien. So können Malignität, Tumortyp und Malignitätsgrad klassifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

Wie sicher sind die histologische und die genetische Klassifizierung anhand des Biopsiematerials, wie viele Biopsien sind zur histologischen Sicherung notwendig, und in welchen Patientengruppen kann die diagnostische Feinnadelbiopsie eingesetzt werden.

Um eine aussagekräftige pathohistologische Diagnose zu bekommen sollten bei Tumoren bis 4 cm Größe jeweils eine Biopsie im Bereich der Tumorperipherie und eine Biopsie im Bereich des Tumorzentrums entnommen werden. Bei größeren Tumoren > 4 cm sollten zwei Biopsien aus dem Tumorrandbereich entnommen werden, da eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Nekrose im Tumorzentrum vorhanden ist.

Die genetische Analyse der Nierenzellkarzinome erbrachte unter Berücksichtigung der pathohistologischen Parameter, dass spezifische chromosomale Aberrationen bestimmte Typen charakterisieren. Durch strukturelle Veränderungen im kurzen Arm des Chromosoms 3 werden mit der Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht. Hier sind offensichtlich Tumorsuppressorgene lokalisiert, deren Funktion durch Verlust oder strukturelle Veränderungen gestört sind. Durch die genetische Analyse mittels der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) konnte eine Differenzierung nach dem Zelltyp bei 67% der Fälle vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die klarzelligen Nierenzellkarzinome durch den Verlust von chromosomalen Material des kurzen Armes des Chromosoms 3 charakterisiert sind. Außerdem wurden Deletionen im langen Arm des Chromosoms 14 sowie der Verlust des gesamten Chromosoms 14, Verluste der Chromosomen 6, 8, 9, Y, Zugewinne des Chromosoms 7, partielle oder vollständige Tri- und Tetrasomien des Chromosoms 5 beobachtet.

Charakteristische genetische Veränderungen für die chromophilen Nierenzellkarzinome waren Zugewinne der Chromosomen 7, 17 sowie der Verlust der Chromosomen 1 und 6.

Für die chromophoben Nierenzellkarzinome waren die Verluste der Chromosomen 2, 13 und 17 charakteristisch.

Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Onkozytome konnte in dieser Arbeit keine genetische Veränderung festgestellt werden.

Die Berücksichtigung des Malignitätsgrades ergab für die klarzelligen NZK eine Häufung des Verlustes des Chromosoms 14 sowie der Verluste der Chromosomen 8 und 9.

Die genetischen Analysen der Nierentumoren haben gezeigt, dass den einzelnen Subtypen spezifische genetische Alterationen zugrunde liegen, die eine wesentlich sichere und eindeutige Differenzierung der NZK als durch die Histologie allein zulassen.

Die genetische Charakterisierung kann bei der Beurteilung der Biopsiezylinder nützlich sein, insbesondere dann, wenn die klassische Pathohistologie keine verwertbaren und/oder indifferenten Ergebnisse erbringt.

Aufgrund der hohen Trefferrate sowie der niedrigen Komplikationen kann die sonographisch gesteuerte Nierentumorbiopsie in lokaler Anästhesie und unter ambulanten Bedingungen erfolgen. Außerdem sind die Kosten der Biopsie einschließlich der pathohistologischen Befunde im Vergleich zu einem offenen operativen Eingriff gering.

Die Indikationen zur präoperativen Feinadelbiopsie von renalen Raumforderungen wären:

- Patienten mit kleinen und/oder homogen strukturierten Nierentumoren, bei denen gutartige Tumore nicht auszuschließen sind.
- Ältere Patienten, insbesondere mit multiplen Begleiterkrankungen, bei denen präoperativ geklärt werden soll, inwieweit sie von einer Operation profitieren.
- Patienten mit Zustand nach partieller Nephrektomie und bestehendem Verdacht auf Lokalrezidiv (insbesondere bei Einzelniere).

2-Einleitung

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist die häufigste maligne Erkrankung der Niere (Brauch, Weirich et al. 2000). Mit 2-3 % aller soliden Malignome ist das NZK ein seltener Tumor; pro Jahr ist in Deutschland mit etwa 8000 bis 11000 Neuerkrankungen zu rechnen (Störkel 1999), (Fischer 1999). Es ist der dritthäufigste urologische Tumor mit der Inzidenz von ca. 5-8 pro 100 000 Männer in den meisten westlichen Ländern. Männer erkranken ungefähr 1,5mal so häufig wie Frauen (Fischer 1999). Die altersbezogene Inzidenz steigt vom 35. Lebensjahr kontinuierlich an und erreicht zwischen der 5. und 6. Lebensdekade den Höhepunkt (80 % aller Nierenzellkarzinome werden zwischen dem 40. Und 69. Lebensjahr gefunden (Störkel 1999). In seltenen Fällen wurde ein Nierenzellkarzinom schon im Kleinkindalter beschrieben (Decker 2002). Durch den Einsatz moderner Diagnostikmethoden wird das NZK in den lokal begrenzten Stadien entdeckt. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien sowie bei unzureichender Therapie treten Lokal- und Fernmetastasen auf.

2.1. Klinische Bedeutung des Nierenzellkarzinoms

2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Die Ursache des NZK ist ungeklärt. Es werden sowohl chemische, physikalische, virale als auch hormonale Mechanismen als auslösende Faktoren diskutiert (Auperin, Benhamou et al. 1994, Talamini, Baron et al. 1990, Yu, Mack et al. 1986, Asal, Risser et al. 1988, Asal, Geyer et al. 1988, Dhote, Pellicer-Coeuret et al. 2000, Handa and Kreiger 2002). Kein Zweifel besteht an der Bedeutung hormoneller Faktoren und dem Übergewicht (Chow, McLaughlin et al. 1996, Benhamou, Lenfant et al. 1993). Insbesondere übergewichtige Frauen zeigen ein bis zu vierfach erhöhtes relatives Risiko für die Ausbildung eines Nierenzellkarzinoms. Eine chronische Niereninsuffizienz begünstigt offensichtlich die Entstehung des Tumors. Prädisponierend für etwa 5% der Fälle ist die chronische Niereninsuffizienz (Fischer 1999). Inwieweit darüber hinaus die arterielle Hypertonie oder Antihypertensiva bzw. Diuretika einen eigenständigen prädominierenden Effekt haben, kann möglicherweise nicht geklärt werden (Fischer 1999). Aufgrund der steigenden Inzidenz in industrialisierten Ländern in Vergleich zu der niedrigen Inzidenz in Dritte-

Welt-Ländern lässt sich vermuten, dass Umwelteinflüsse bei der Entstehung des NZK kritische Faktoren darstellen. Die Nierenzellkarzinome treten sowohl sporadisch als familiär auf. Das seltene familiäre NZK tritt in Verbindung mit Morbus von Hippel-Lindau auf (Kovacs 1993). Genetische Untersuchungen zeigten bei nichtfamiliären Formen sowie bei erkrankten Familienmitgliedern Chromosomenaberrationen am Chromosom 3 (Maher and Yates 1991), so dass anzunehmen ein Defekt am Chromosom 3 verantwortlich für die Progression des NZK ist.

2.1.2. Symptomatik und rationale Diagnostik

Schmerzen, Hämaturie und palpabler Flankentumor- die klassische Symptomentrias werden heute lediglich noch bei 5-32 % aller Patienten beobachtet. Durch den flächendeckenden Einsatz moderner bildgebender diagnostischer Verfahren, insbesondere der Sonographie, werden heute bis zu 70 % der Nierentumoren in asymptomatischen Stadien diagnostiziert. Bei Patienten im Spätstadium können Beschwerden seitens der Metastasen (Knochenschmerzen) oder paraneoplastischer Syndrome zur Diagnose führen (Decker 2002). Darüber hinaus können auch subfebrile Temperaturen, Gewichtsabnahme, erhöhte Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen, Nachtschweiß und Anämie sowie in 10 % der Fälle Polyglobulie auftreten.

Zur Diagnostik renaler raumfordernder Prozesse ist die Ultraschalluntersuchung eine der wichtigsten Untersuchungsmethoden. Es gibt Zahlen über eine >90 %ige Treffsicherheit in der Diagnostik der Angiolipome, und über eine diagnostische Unsicherheit bei Onkozytomen (Smith 1991). Mit der Sonographie ist es möglich mit fast 100%iger Sicherheit zwischen einer klassischen Zyste und einem soliden Tumor zu differenzieren. Schwierigkeiten kann jedoch die Unterscheidung zwischen benignen und malignen Tumoren bereiten.

Die Computertomographie kann zu über 90 % einen malignen Tumor diagnostizieren. Trotz der Genauigkeit der CT in Verbindung mit Ultraschall bleibt bei ca. 5 % der Patienten die Dignität der Raumforderungen unklar. Die Feinnadelbiopsie des Tumors ist die einzige Untersuchungsmethode, die in der Lage ist, vor einer operativen Exploration mit Schnellschnittuntersuchung, Aussagen zum histologischen Typ und zum Malignitätsgrad und somit zur Dignität zu liefern. Die pathohistologische Diagnose der Nierentumore ist maßgebend für die Therapieentscheidung. Außerdem kann die Feinnadelbiopsie der Nierentumore bei nicht operablen Patienten Hinweise auf das

mögliche Aussprechen einer Immunchemotherapie liefern. Weiterhin kann die perkutane Biopsie bei Patienten mit einer disseminierten Metastasierung zur Klärung des Primärtumors beitragen.

Klinisch verwertbare Tumormarker sind für das Nierenzellkarzinom im Vergleich zu anderen urologischen Tumoren wie z. B. dem Hodenkarzinom und dem Prostatakarzinom nicht bekannt.

Welche differentialdiagnostischen Schwierigkeiten die Abklärung einer renalen Raumforderung bereiten kann, soll folgende Kasuistik verdeutlichen.

Es handelte sich um einen 14-jährigen Patienten mit dem Verdacht auf zystisches Nephrom bzw. zystisches Nephroblastom.



Abb. 1: Sonographische Darstellung der linken Niere bei dem 14-jährigen Patienten

Das renosonographische Bild der linken Niere zeigte eine 4 x 4,5 cm messende kleinzystische und solide Raumforderung am oberen und mittleren Nierendrittel. (Abb. 1) Die rechte Niere war unauffällig.

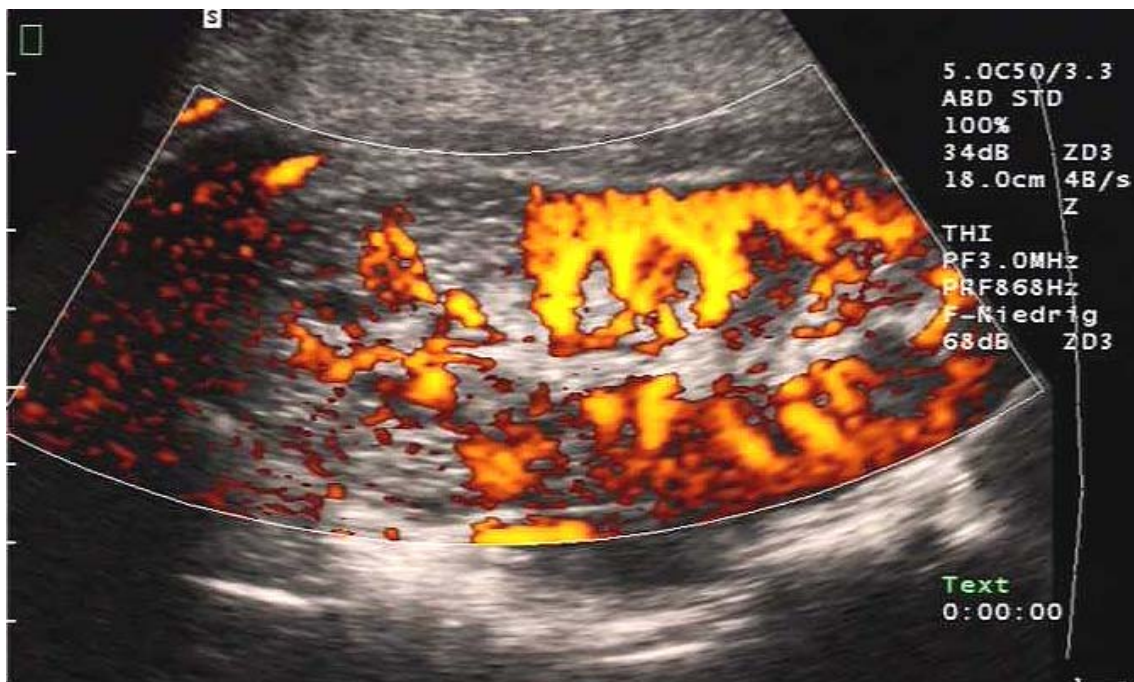


Abb. 2: Dopplersonographische Darstellung der linken Niere desselben Patienten

Die Duplex-Sonographie erbrachte eine Perfusion der Raumforderung. (Abb. 2)

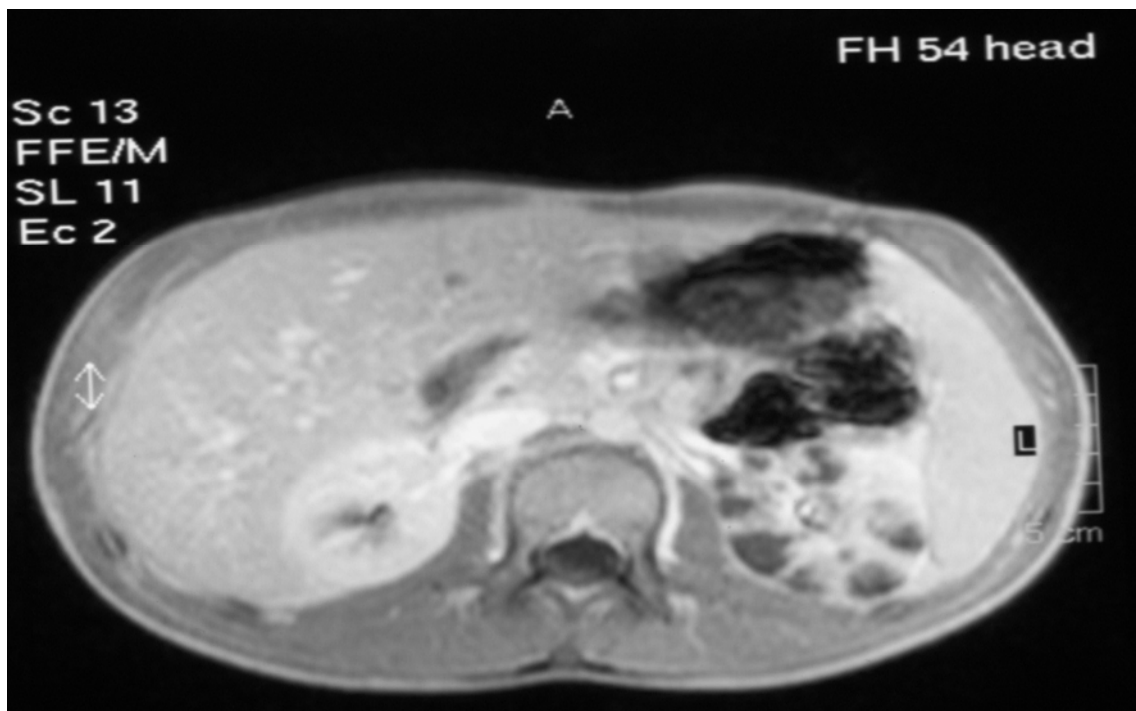


Abb. 3: Nativ-MRT

Im Nativ-Magnetresonanztomogramm fand sich eine deutlich vergrößerte Niere Links im Seitenvergleich, insbesondere im Bereich des oberen und mittleren Nierendrittels. Hier ließen sich stark hyperintense Areale im oberen Polbereich nachweisen, die im mittleren Nierendrittel mehr kegelförmig liquide konfiguriert mit Markbezug waren. (Abb. 3)

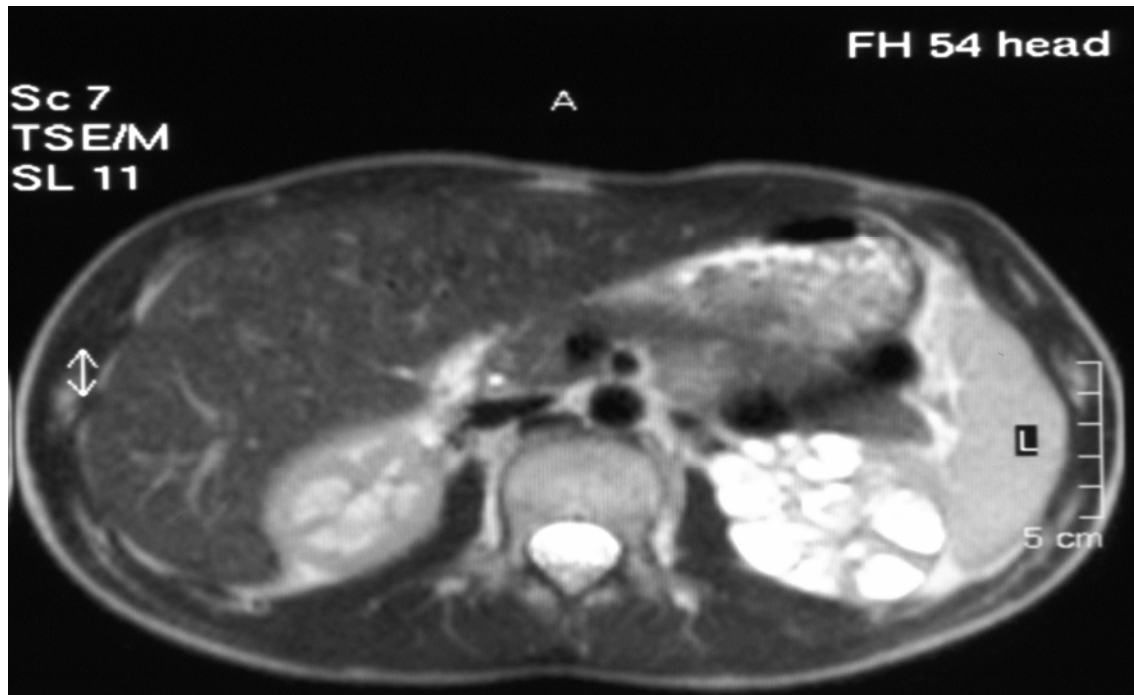


Abb. 4: Kontrastmittel-MRT

Das Kontrastmittel-Magnetresonanztomogramm zeigte schließlich keinerlei Signalintensitätszunahme. (Abb. 4)

Da trotz verschiedener bildgebender Verfahren der Ausschluss eines malignen zystischen Wilms-Tumors nicht möglich war, musste eine operative Nierenfreilegung erfolgen. Erst die histopathologische Aufarbeitung des Präparates konnte die Dignität des raumfordernden Prozesses klären. Es handelte sich um eine fokale segmentale zystische Degeneration der Niere.

2.2. Klinische und pathomorphologische Grundlagen der Nierentumorklassifikation

Das Nierenzellkarzinom wurde bereits im frühen 19. Jahrhundert beschrieben und sein Ursprung dem tubulären Epithel zugeordnet. Zunächst setzte sich 1883 die Theorie von Grawitz durch, dass das Nierenzellkarzinom aus ektopen adrenalen Zellen im Nierengewebe abzuleiten sei, da sich die Karzinomzellen in ihrem Fettgehalt nicht von Zellen der Nebenniere unterscheiden. In der älteren Literatur wird daher das Nierenzellkarzinom auch als Grawitz-Tumor oder Hypernephrom bezeichnet (Decker 2002).

1981 wurde eine neue WHO-Klassifizierung erstellt, diese unterschied zwischen benignen (Adenome) und malignen (Karzinome) Nierenzelltumoren.

Basierend auf zytologischen und histologischen Kriterien brachten die grundlegenden Arbeiten von Thoenes et al. Mitte der 80er Jahre einen neuen Impuls für morphologische Nierentumorklassifikation. Dieses Klassifikationssystem ermöglicht eine Einteilung in Subtypen und die histogenetische Zuordnung unter Berücksichtigung elektronenmikroskopischer und immunhistologischer Befunde. Diese Klassifikation umfasst 5 Grundzellgruppen, 5 Wachstumsformen und 3 Differenzierungsgrade. (Thoenes, Störkel et al. 1986, Ziegler 1991, Gettman and Blute 2002, Decker 2002, Gunia, May et al. 2004). (Tabelle 1)

Tabelle 1: Thoenes Klassifikation des Nierenzellkarzinome

Grundzelltyp	Wachstumsmuster	Differenzierungsgrad
1. klarzellig 2. chromophil 3. chromophob 4. Duct-Bellini-Karzinom 5. Onkozytom	1. tubulär 2. zystisch 3. tubulo-papillär 4. acinär 5. .solide/kompakt	1. Grad 1 (gut differenziert) 2. Grad 2 (mäßig differenziert) 3. Grad 3 (schlecht differenziert)

In der neuen WHO-Klassifizierung wurden die histologischen Merkmale (azinär, zystisch, papillär und solid) sowie die zytologischen Merkmale (klar, granulär, Onkozyten, pleomorph und spindelförmig) berücksichtigt.

1998 legten die WHO in Zusammenarbeit mit der Union Internationale Contre le Cancer und dem American Joint Committee on Cancer eine aktualisierte Klassifikation vor (Störkel 1999). (Tabelle 2)

Tabelle 2: Klassifikationsschemata epithelialer Nierentumoren

WHO (1981)	New Classification (UICC)	WHO (1998)
Renal cell adenoma	RCA, metanephric type RCA, papillary type (chromophil) RCA, oncocytic type	metanephric adenoma tub-pap. adenoma oncocytic adenoma
Renal-cell carcinoma	RCC, clear cell type RCC, papillary type (chromophil) RCC, chromophobe type RCC, collecting duct type RCC, neuroendocr. type RCC, unclassified	clear cell carcinoma papillary carcinoma chromophobe carcinoma collecting duct carcinoma granular cell carcinoma granular cell carcinoma spindle cell carcinoma cyst associated carcinoma

Im Vergleich mit der WHO-Klassifikation (1998) gibt es in der neuen Klassifikation der UICC kein Nierenzellkarzinom vom granulären Typ. Dies begründet sich darin, dass granuläre (eosinophile) Zellformen bei nahezu allen Subtypen der Nierentumoren gefunden werden. Das spindelzellige Nierenzellkarzinom wird ebenfalls nicht als eigenständige Entität aufgefasst, da alle Nierenzellkarzinome im Laufe ihrer

Enddifferenzierung einen spindelförmigen Phänotyp annehmen können. Aufbauend auf dieser neuen Klassifikation ergeben sich für die verschiedenen Subtypen der epithelialen Nierentumoren folgende Inzidenzen (Störkel 1999). (Tabelle 3)

Tabelle 3: Inzidenz epithelialer Nierentumoren

Tumortyp	Häufigkeit
1. Klarzelliges Nierenzellkarzinom	(73%)
2. Papilläres (chromophiles) NZK <ul style="list-style-type: none"> • Eosinophil • Basophil 	(12%)
3. Onkozytäres Adenom	(5%)
4. Chromophobes NZK	(5%)
5. Sammelgang-Karzinom (Bellini duct Karzinom)	(<1%)
6. Urothelkarzinom (intrarenal)	(<1%)
7. Neuroindokrine Tumoren (Karzinoid, kleinzellig, NZK, primitiver neuroektodermaler Tumor)	(<1%)
8. Metanephrogenes (embryonales) Adenom	(<1%)
9. Spindelzellig-pleomorphes NZK	(<1%)
10. Unklassifiziertes NZK	

2.2.1. Malignitätsgrad

Das Grading wird durch den Grad der Kernatypien bestimmt. Als weiteres Merkmal werden die des Zytoplasmas zur Einteilung herangezogen. Nach Syrjän und Hjelt (Syrjanen and Hjelt 1978) können 4 Kerngrade bestimmt werden:

Grad 1

- rundliche Kerne ungefähr gleicher Größe
- feine Chromatinstreifen
- unauffällige Nucleoli
- wenige Mitosefiguren

Grad 2

- Tendenz zu rundlichen Kernen, z. T. Anisonucleose
- raues, klumpiges Chromatin, geringe Hyperchromasie
- unterschiedliche, häufig irreguläre Nucleoli
- vereinzelt pathologische Mitosefiguren

Grad 3

- auffällige Anisonucleose
- raues, klumpiges Chromatin, deutliche Hyperchromasie
- viele pathologische Mitosefiguren

Grad 4

- vollständige Anisonucleose
- grobes, klumpiges Chromatin erweckt anschein der Hyperchromasie
- große, irreguläre Nucleoli
- zahlreiche pathologische Mitosefiguren

2.2.2. pTNM-Klassifikation der UICC (2002)

Mit der aktuellen pTNM-Klassifikation der UICC von 2002 werden die Tumorausdehnung (T), regionäre Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) erfasst.

T-Kategorie (Primärtumor)

Tx- Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0- Kein Anhalt für Primärtumor

T1- Tumor 7,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere

T1a- Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung

T1b- Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung

T2- Tumor mehr als 7,0 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere

T3- Tumor breitet sich aus bis in die Hauptvenen oder infiltriert die Nebenniere oder das perirenale Fettgewebe, aber nicht außerhalb der Gerotaschen Faszie

T3a- Tumor infiltriert die Nebenniere oder das perirenale Fettgewebe, aber nichtjenseits der Gerotaschen Faszie.

T3b- makroskopische Tumorausdehnung in die Vena renalis oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells

T3c- makroskopische Tumorausdehnung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells

T4- Tumordinfiltration jenseits der Gerotaschen Faszie

N-Kategorie (Lymphknoten)

Regionale Lymphknoten sind die hilären, paraaortalen und paracavalen Lymphknoten. Kontralateraler Befall hat keinen Einfluss auf die N-Kategorie

Nx- Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0- Kein Anhalt für regionäre Lymphknoten

N1- Metastasen in einem regionären Lymphknoten

N2- Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

M-Kategorie (Fernmetastasen)

Mx- Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

M0- keine Fernmetastasen

M1- Fernmetastasen

2.3. Genetische Merkmale der Nierenzellkarzinome

Durch die intra- und intertumorale morphologische Heterogenität der Nierenzellkarzinome ist eine Diagnose nach zytologischen Kriterien nicht immer sicher möglich. Um die phenotypische Heterogenität umgehen zu können, wurden Nierenzelltumoren nach genetischen Merkmalen charakterisiert. Hier kommt jedem Tumortyp ein spezifisches chromosomales Aberrationsmuster zu (Linehan, Gnarr et al. 1993).

Die Heidelberg-Klassifizierung beruht auf der Spezifität grundlegender genetischer Alterationen, die mit der Entstehung bestimmter Tumortypen und während der gesamten Tumorprogression in den Tumorzellen konstant erhalten bleiben (Kovacs, Akhtar et al. 1997; Störkel, Eble et al. 1997).

Heidelberg-Klassifizierung der Nierenzelltumore (Kovac 1997)

Bösartige Tumoren:

- Konventionelles Nierenzellkarzinom
- Papilläres (chromophiles) Nierenzellkarzinom
- Chromophobes Nierenzellkarzinom
- Sammelrohrkarzinom
- Nicht klassifizierbare Nierenzellkarzinome

Gutartige Tumoren:

- Metanephrogenes Adenom
- Papilläres Adenom
- Nierenonkozytom

2.3.1. Klarzellige Nierenzellkarzinome

Klarzellige Nierenzellkarzinome machen ca. 75-80% der NZT aus (Kovacs 1999). Sie treten sporadisch und hereditär auf.

Eine Deletion der -3p-Region kommt in 98 % der klarzelligen NZK vor (Kovacs 1999). Somit charakterisiert ein Allelverlust am kurzen Arm des Chromosoms 3 klarzellige NZK und stellt gleichzeitig den Tumorsuppressorgenlocus für diesen Tumortyp dar. Bisher als einziges Tumorsuppressorgen konnte hier das VHL-Gen identifiziert werden. Die Lokalisation des VHL-Gens wird im Bereich 3p25-26 definiert (Pack, Zbar et al. 1999, Latif, Tory et al. 1993). Als weitere Regionen für Tumorsuppressorgene bei den sporadischen Formen sind die Regionen 3p21-22 und 3p13-14 zu nennen. Hierzu kommen Allelduplikationen am Chromosom 5q sowie Allelverlust an den Chromosomen 6q, 8p, 9p und 14q. (Kovacs 1999, Linehan, Walther et al. 2003).

Von-Hippel-Lindau-Syndrom

Das VHL-Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbare Erkrankung, die mit einer Häufigkeit von etwa 1:45 000 vorkommt.

Das VHL-Gen wurde vollständig von der Arbeitsgruppe Zbar et al. identifiziert (Zbar, Kaelin et al. 1999, Latif, Tory et al. 1993). Eine Keimbahnmutation des VHL-Gens ist mit einem hohen Risiko für die Entstehung multipler, bilateraler Nierenzysten und klarzelliger NZK (Typ 1), sowie für die Entwicklung multipler Hämangioblastome und Phäochromozytome (Typ 2) im Zusammenhang mit dem VHL-Syndrom verbunden (Maher, Iselius et al. 1991, Linehan, Walther et al. 2003). Die Genträger für das VHL-Syndrom können in den Nieren sowohl benigne Zysten als auch Nierenzellkarzinome entwickeln. Etwa 76 % der Patienten entwickeln Zysten und 24-28 % Karzinome. Obwohl diese Tumore oft klein und auf die Niere begrenzt sind, handelt es sich um potentiell maligne und möglicherweise schon metastasierende Tumoren. Wichtige und charakteristische Merkmale der renalen VHL-Läsionen sind ihre Multifokalität und das bilaterale Auftreten (Decker, Neuhaus et al. 1996; Decker 2002, Phillips, Ghadimi et al. 2001, Phillips, Pavlovich et al. 2001).

2.3.2. Papilläre Nierenzellkarzinome

Papilläre NZK machen ca. 10 % aller Nierentumore aus. Diese sind im Gegensatz zu klarzelligen NZK nicht durch Allelverlust, sondern durch Allelduplikationen spezifischer chromosomaler Abschnitte gekennzeichnet. Die häufigsten Alterationen stellen Zugewinne der Chromosomen 7, und 17 sowie den Verlust des Y Chromosoms in männlichen Patienten dar, bei fortgeschrittenen Tumoren finden sich Zugewinne der Chromosomen 3,12,16,20 (Jiang, Richter et al. 1998; Junker, Weirich et al. 2003).

Papilläre (chromophile) Nierenzelladenome weisen eine Trisomie des Chromosoms 7 und eine Tri- bzw. Tetrasomie 17 auf.

2.3.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome

In 75 % bis 100 % der chromophoben Nierenzellkarzinome sind die Kombination von spezifischen Chromosomenalterationen in Form von Monosomien der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17, und 21 charakteristisch. Durch den Verlust mehrerer Chromosomen kommt es bei chromophoben NZK zu einem hypodiploiden Karyotyp (Gunawan, Bergmann et al. 1999; Phillips, Pavlovich et al. 2001)

2.3.4. Sammelrohrkarzinome (Ductus-Bellini-Karzinome)

Die histologische Diagnose der Ductus-Bellini-Karzinome ist häufig unsicher. Frühere Mitteilungen wiesen eine Monosomie der Chromosome 1, 6, 14, 15, und 22 auf, während eine Aberration an den Chromosomen 8p- und -13 von anderen Gruppen bestätigt wurden (Störkel 1999).

2.3.5. Nicht klassifizierbare Nierenzellkarzinome

Ca. 3-5 % der Nierenzellkarzinome zeigen eine ungewöhnliche Charakteristik und können nicht eindeutig einer der bekannten Gruppen der Nierenzellkarzinome zugeordnet werden. Aufgrund der spezifischen genetischen Alterationen gehören die sarkomatösen Nierenzellkarzinome nicht zu dieser Gruppe, sondern zu den konventionellen, papillären oder chromophoben NZK.

2.3.6. Metanephrogene Adenome

Das metanephrogene Adenom ist ein seltener gutartiger Tumor der Niere. Für diese Tumore liegen bislang keine sicheren zytogenetischen Daten vor.

2.3.7. Nierenonkozytome

Onkozytome sind die einzig klar definierten gutartigen Tumore der Niere. Eine Abgrenzung von der eosinophilen Variante des chromophoben Nierenzellkarzinoms und des eosinophilen klarzelligen Karzinoms ist häufig nicht möglich. Zytogenetisch wurden drei Gruppen der Nierenonkozytome identifiziert.

Die erste Gruppe der Nierenonkozytome zeigt eine Monosomie des Chromosoms 1 und/oder Chromosoms 14q sowie den Verlust des Y Chromosoms. Eine zweite Gruppe zeigt eine balancierte Translokation zwischen Chromosom 11q13 und anderen Chromosomen. Eine dritte Gruppe weist keine sichtbaren genetischen Alterationen auf oder zeigt unspezifische Veränderungen.

Entscheidend für die Differentialdiagnose ist, dass keine der analysierten Nierenonkozytome die Kombination von spezifischen genetischen Alterationen zeigten, die für klarzellige, papilläre oder chromophobe Nierenzellkarzinome charakteristisch sind (Phillips, Pavlovich et al. 2001).

In der Tabelle 4 sind die genetischen Merkmale der verschiedenen Tumortypen dargestellt.

Tabelle 4: Genetische Tumormerkmale verschiedener Tumortypen

Tumortyp	Monosomie, Allelverlust	Allelduplikation	Trisomie	Sonstige Veränderungen
Klarzellige Nierenzellkarzinome	Chromosom 3p, 6q, 8p, 9p und 14q.	Chromosom 5q.		Mutation des VHL- Gens
Papilläre, (chromophile) Nierenzellkarzinome			Ch. 3q, 7, 8p, 12q, 16q, 17q und 20.	Verlust des Chromoso m Y.
Chromophobe Nierenzellkarzinome	Chromosom 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 20.			
Sammelrohrkarzinome (Ductus-Bellini- Karzinome)	Chromosom 1, 6, 15, 18 und 22.			
Nicht klassifizierbare Nierenzellkarzinome	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	
Metanephrogene Adenome	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	
Papilläre Adenome			Chromoso m 7 und 17	
Nierenonkozytome	Chromosom 1 und 14, sowie Y- Verlust.			Translokati onen zw. 11q13 u. anderen Ch.

3. Zielstellung

Durch die Ultraschalluntersuchung und den flächendeckenden Einsatz moderner bildgebender Verfahren wie der Computertomographie und Magnetresonanztomographie werden immer häufiger kleinste Nierentumoren zufällig entdeckt (Warshauer, McCarthy et al. 1988, Heidenreich and Ravery 2004). Nach bisherigen Erkenntnissen werden nicht klarzellige Nierentumoren bis 1 cm Tumorgroße als nicht maligne eingestuft (Wunderlich, Dreihaupt et al. 2004). Jedoch ist die Situation schwierig, da kleine Nierenzellkarzinome schwierig, wenn nicht unmöglich, von Nierenadenomen, Angiomyolipomen, Onkozytomen und von anderen gutartigen Krankheiten mittels der bildgebenden Verfahren zu unterscheiden sind. Außerdem können viele Läsionen, wie entzündlicher Pseudotumor, Metastase, Lymphom, Abszess und Hämatom Nierentumoren simulieren. Zusätzlich können komplizierte Zysten nicht mit ausreichender Sicherheit als bösartig oder gutartig eingeschätzt werden (Wood, Khan et al. 1999).

Die Feinnadelbiopsie der unklaren Nierenraumforderungen ist eine seit langer Zeit in Europa bekannte diagnostische Methode, wurde jedoch selten praktiziert, da die Biopsie mit einer hohen Fehlerrate verbunden war. Diese beruhte auf der unsicheren sonographischen Darstellung kleiner Tumorherde und deren sichere Punktion.

In den letzten Jahren sind diesbezüglich deutliche technologische Fortschritte gemacht worden, so dass es auch möglich ist, aus kleinen Raumforderungen der Niere unter dopplersonographischer Kontrolle Gewebeproben zu entnehmen.

Die klinische Bedeutung dieser Arbeit liegt in der Möglichkeit, die relativ seltenen benignen Nierentumoren, deren Dignität derzeit präoperativ nicht abschätzbar ist, minimalinvasiv diagnostizieren zu können. Erste Studien zur perkutanen Feinnadelbiopsie der kleinen Nierentumoren (meistens CT-gesteuert) zeigten eine hohe Inzidenz bei gutartigen Tumoren an (Neuzillet, Lechevallier et al. 2004, Smith 1991, Johnson, Nazarian et al. 2001).

Ziel dieser Studie ist deshalb die Bewertung der Aussagekraft der sonografisch gestützten Feinnadelbiopsie. Hierzu erfolgte die pathohistologische und genetische Klassifizierung der gewonnenen Biopsien.

Die pathohistologische Untersuchung soll anhand des Biopsiematerials die Malignität, der Tumortyp und das Grading diagnostizieren.

Die Zielstellung der genetischen Untersuchung ist, die Tumorbiologie unklarer Nierentumoren zu identifizieren. Außerdem sollten die spezifischen Chromosomenaberrationen unterschiedlicher Subtypen der Nierenzellkarzinome und die Differenzierung nach Malignitätsgrad festgestellt werden.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- Wie sicher ist die histologische Klassifizierung anhand von 5 Biopsien
- Wie viele Biopsien sind zur histologischen Sicherung notwendig
- Kann die genetische Analyse zur Sicherung der Diagnose beitragen
- In welchen Patientengruppen kann die diagnostische Feinnadelbiopsie eingesetzt werden

4. Materialien und Methoden

Die Entwicklung neuer molekularbiologischer Methoden brachte in den letzten Jahren einen enormen Fortschritt im Bereich der molekularen Diagnostik. Mittlerweile stehen eine Vielzahl methodischer Ansätze zur Verfügung. In letzter Zeit erlangte die komparative genomische Hybridisierung eine besondere Bedeutung. Diese neue Methode kann der Diagnosestellung, Subklassifikation und Prognoseschätzung dienen sowie die Therapieplanung beeinflussen (Kallioniemi; Kallioniemi et al. 1994).

Die Vergleichende Genomische Hybridisierung wurde von Kallioniemi et. al. 1992 entwickelt. Dieses molekularzytogenetische Verfahren dient dem Nachweis primär unbekannter Abberationen (Gewinne und Verluste genetischen Materials) des gesamten Genoms (Roth, Wolf et al. 1996, Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1993).

Das Verfahren basiert auf der konkurrierenden Hybridisierung unterschiedlich markierter Tumor (=Test)- und Normal(=Kontroll)-DNA auf normale menschliche Metaphasechromosomen (z. B. von Lymphozyten). Die Tumor-DNA wird zunächst mit Biotin, die Normal-DNA mit Digoxigenin markiert. Tumor- und Normal-DNA werden gemischt und auf Metaphasenplatten hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt unter Zugabe nicht markierter Cot-1 DNA, um die Bindung der Wiederholungssequenzen, vor allem im Zentromerbereich, zu blockieren. Es wird Avidin-FITC (grüne Fluoreszenz) zur Detektion der Biotin-markierten Tumor-DNA, bzw. Anti-Digoxigenin-Rhodamin (rote Fluoreszenz) zur Detektion der Digoxigenin markierte Normal-DNA eingesetzt. Die Gegenfärbung mit DAPI (blau) erfolgt, um die Zuordnung der einzelnen Chromosomen zu ermöglichen, die das spezifische Bandenmuster der Chromosomen sichtbar macht. Die Chromosomen werden mit einer CCD-Kamera aufgenommen und mittels eines digitalen, computergestützten Bildanalysensystems dokumentiert (Petersen, Schwendel et al. 1996; Harada, Shiraishi et al. 2000; Kuukasjarvi, Tanner et al. 1997).

Überexprimentierte DNA-Sequenzen werden als hohes, unterexprimentierte als niedriges Grün/Rot-Verhältnis visualisiert.

Die Vorteile der CGH liegen in der Möglichkeit, sowohl Frischmaterial als auch in Paraffin eingebettetes Material zu verwenden. Speziell bei der Analyse geringer Tumormaterialmengen kann man nach Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Oligonukleotidprimern (DOP-PCR) (Störkel, Simon et al. 1996; Mullis 1990) die CGH einsetzen, um einen Überblick über die genetischen Veränderungen eines Tumors auf

chromosomaler und subchromosomaler Ebene erlangen (Petersen, Schwendel et al. 1996; Stetler, Das et al. 1982; du Manoir, Kallioniemi et al. 1995; Weiss, Hermesen et al. 1999).

Die CGH ist allerdings eine aufwendige und noch kostenintensive Methode. Ein limitierender Faktor für die routinemäßige Anwendung ist der Zeitaufwand einer Untersuchung. Die Analyse eines Tumors könnte unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Woche durchgeführt werden. Die Materialgewinnung, die DNA-Isolation, Amplifikation und Markierung, die Hybridisierung und die Fluoreszenzdetektion, benötigen 4 Tage. Die Aufnahme und Auswertung der Fluoreszenzbilder dauert einen Tag. Auch wenn mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet werden können, beträgt der Zeitaufwand pro Tumorprobe ca. 2 Tage. Die Kosten für Verbrauchsmaterialien sowie der Preis für die notwendigen Geräte sind noch relativ hoch.

4.1. Materialgewinnung

Bei 50 Patienten mit computertomografisch gesichertem Nierentumor wurden unmittelbar nach radikaler Tumornephrektomie oder partieller Nephrektomie aus 5 Regionen des Tumors (1x zentral und 4x peripher) Biopsien entnommen.

Alle Biopsien wurden von einem Urologen mit einer 18-gauge Nadel durchgeführt. Die Biopsien wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffinblöcken eingebettet. Die Untersuchung der Präparate erfolgte nach klassischen Untersuchungstechniken wie Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Histo- und Immunhistochemischer sowie Hale-Färbung und Elektromikroskopie.

Alle 250 Präparate wurden von einem Pathologen mikroskopisch untersucht und histologisch bewertet. Die Ergebnisse wurden mit dem Histologiebefund des Gesamttumors verglichen. In ca. 100 Fällen stimmten die histologischen Befunde nicht überein und eine genetische Überprüfung wurde angeschlossen.

Die pathohistologische Bewertung der Nierentumoren erfolgte in dem Institut für Pathologie der Friedrich Schiller Universität Jena nach der WHO-Klassifikation von 1997. Manche Präparate wurden zusätzlichen Untersuchungen wie Hale-Färbung und Immunhistochemie unterzogen.

4.2. Comparative Genomic Hybridization- CGH

4.2.1. DNA-Isolation

Aus den paraffineingebetteten Präparaten wurden Schnittpräparate (8µm) angefertigt. Zunächst wurden die Paraffinschnitte durch Waschen in Xylol (zweimal 10 min) entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte im Propanol 70% und 50% Ethanol (je zweimal 5 min) rehydriert und 10 min. mit Aqua bidest gewaschen.

Die DNA-Isolation erfolgt nach folgendem Protokoll:

Protokoll für DNA- Isolation

1. Das Tumormaterial in ein 1,5 ml Tube geben und 180 µl ATL-Puffer zugeben.
2. 20 µl Proteinase K zugeben, mixen und bei 56°C 1-3h inkubieren, bis das Gewebe gelöst ist.
3. 200 µl AL-Puffer zugeben, gut mixen und 10 min. bei 70°C inkubieren.
4. 200µl Ethanol zugeben, gut mixen.
5. Den Inhalt von Schritt 4 in ein QUIamp spin column pipetieren, den Deckel schließen und bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugieren.
6. QUIamp spin column in ein neues collection tube geben. Altes tube mit Filtrat verworfen.
7. 500 µl AW1- Puffer zugeben, den Deckel schließen und bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugieren.
8. QUIamp spin column in ein neues collection tube geben. Altes tube mit Filtrat verworfen.
9. 500 µl AW2-Puffer zugeben, den Deckel schließen und bei 14000 rpm für 3 min. zentrifugieren.
10. QUIamp spin column in ein 1,5 tube geben und das collection tube mit dem Filtrat verworfen.
11. In das neue tube 100µl AE-Puffer zugeben und 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren, bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugieren.
12. Schritt 11 wiederholen.

4.2.2. DOP-PCR: (Degenerate Oligonucleotide Primer Chain Reaktion)

Aufgrund der geringen DNA-Menge, die man aus einer Feinnadelbiopsie gewinnen kann, muss die DNA durch ein Verfahren, mit dem die gesamte genomische DNA amplifiziert werden kann, vermehrt werden. Hierzu wurde die DOP-PCR eingesetzt.

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren: Spezifische DNA-Sequenzen können in einem Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden.

Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Verdopplung der DNA in der Zelle. Eine DNA-Polymerase (ein DNA-vervielfältigendes Enzym) synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize. Das Enzym braucht einen RNA-Primer, ein Nukleinsäuremolekül, das mit dem Matrizenstrang hybridisiert und als Starter genutzt wird.

Für die PCR werden eine DNA- oder RNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynucleotide, zwei Oligonucleotide als Primer und geeignetes Puffersystem benötigt.

Die gesamte Reaktion basiert auf drei Phasen mit unterschiedlichen Temperaturen, die ständig wiederholt werden. In der ersten Phase, *Denaturierung der DNA-Doppelstränge*, wird die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. In der zweiten Phase, *Hybridisierung der Oligonukleotidprimer*, hybridisieren die Oligonukleotidprimer mit beiden DNA-Matrizensträngen und dienen in der dritten Phase, *Polymerisation*, als Startmoleküle zur Kopierung der beiden Matrizenstränge. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge von den Startmolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial (Sachse 1994; Kuukasjarvi, Tanner et al. 1997; Lage, Leamon et al. 2003; Hirose, Aldape et al. 2001; Bolzer, Craig et al. 1999; Mullis 1991).

Das folgende Protokoll zeigt die Vorbereitungsschritte für die notwendigen Lösungen sowie die Zyklen für die DOP-PCR.

Protokoll für DOP-PCR

Lösung A

Nach DNA-Isolation Transfer jeder Probe in 5 µl der folgenden Mixtur:

		Ausgangskonzentration	Endkonzentration
H ₂ O	10,125µl		
Sequenase-Puffer SB	1,8µl	5x	0.6x
Primer DOP	1,87µl	40µM	5µM
dNTPs	1,2µl	2.5mM	200µM

Lösung B (Enzym für PCR-Zyklen mit niedriger Temperatur)

Pro tube sind 0,24µl für jeden der 8 Zyklen notwendig (=0,2µl).

Sequenase-Dilutionspuffer	5,25µl
Sequenase	0,75µl

Lösung C (PCR-Mixtur für PCR-Zyklen mit hoher Temperatur ohne Enzym)

Pro tube sind 45µl notwendig.

		Ausgangskonzentration	Endkonzentration
H ₂ O	70,45µl		
Stoffel-Puffer	10µl	10x	1x
dNTPs	8,8µl	2,5µM	220µM
Primer DOP	2,75µl	40µM	1,1µM
MgCl ₂	10µl	25mM	2,5µM

Lösung D (PCR-Mixtur für PCR-Zyklen mit hoher Temperatur)

Pro tube sind 5µl notwendig.

		Ausgangskonzentration	Endkonzentration
H ₂ O	8,75µl		
Stoffel-Puffer	1,25µl	10x	1x
MgCl ₂	1,25µl	25mM	2,5mM
Stoffel-Fragment	1,25µl	10U/µl	1U/µl

Arbeitszyklen in der DOP-PCR-Thermocycler

1)	96°C	5'
2)	30°C	2'20'' in jedem Zyklus 0,24 Lösung B zufügen
3)	37°C	2'
4)	95°C	1'
5)		7x wiederholen ab Schritt 2 (=8 Zyklen)
6)	30°C	2'20'' 45µl Lösung C zufügen
7)	95°C	1'
8)	56°C	2'20'' 5µl Lösung D zufügen
9)	72°C	2'
10)	94°C	1'
11)	56°C	1'
12)	72°C	2'
13)		31x wiederholen ab Schritt 10 (=32 Zyklen)
14)	72°C	10'
15)	4°C	Bis Entnahme

4.2.3. DNA-Markierung

Nun wurden die Proben in einer 2. PCR über 32 Zyklen markiert. Die Tumor-DNA wurde mit Biotin-16-dUTPs, die Normal-DNA mit Digoxigenin-11-dUTPs markiert, um in der CGH die Signalintensitäten von Tumor- und Kontroll-DNA beurteilen zu können.

Folgendes Protokoll zeigt die Vorbereitungsschritte für die notwendigen Lösungen sowie die Zyklen für die Markierungs-PCR.

Protokoll für Markierungs-PCR

Für jede Probe 2 µl PCR und 18 µl PCR Mixtur.

		Ausgangskonzentration	Endkonzentration
H ₂ O	10,08µl		
AmpliTaq Puffer	2µl	10x	1x
dNTPs label	2µl	10x	1x
Biotin/Dig-dUTP	2µl	1mM	100µM
Primer DOP	1µl	40µM	2µM
MgCl ₂	0,8µl	25mM	2,5mM
AmpliTaq	0,12µl	5U/µl	0,03U/l

PCR- Zyklen

1)	96°C	3'
2)	94°C	1'
3)	56°C	1'
4)	72°C	2'
5)		19x wiederholen ab Schritt 2
6)	72°C	5'
7)	4°C	Bis Entnahme

Anschließend wurde die amplifizierte DNA mittels Sephadex-Säulen gereinigt und die Tumorkonzentration gemessen.

4.2.4 Hybridisierung

Hier wurde 1 µg markierte Tumor-DNA, 1 µg markierte Normal-DNA und 50 µg unmarkierte Cot-1-DNA zusammen gemischt. Danach erfolgte die Ausfällung der DNA in zweifachem Volumen Ethanol. Zentrifugation.

Die Proben wurden mit Hybridisierungsmix gelöst (30min, 37°C) und bei 70° C für 5 min im Wasserbad denaturiert. Dabei spalten sich die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge auf.

Die Objektträger wurden in 70% Formamid/2xSSC bei 70° C 2min denaturiert. Auch hier wird die DNA der Lymphozyten in Einzelstränge überführt. Anschließend wurden sie in 70%igen Ethanol für 2 min gestellt. Dies verhindert die Renaturierung der DNS. Die Objektträger wurden weiter in 85% und 100% Ethanol dehydriert und luftgetrocknet.

Nach 30minütiger Vorinkubation wurden die Proben auf die Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen zugedeckelt, mit Fixogum verschlossen und in einer feuchten Kammer 2-4 Tage bei 37° C hybridisiert. In dieser Phase erfolgt die Anlagerung der Tumor- und Normal-DNA an komplementäre Sequenzen auf der in Einzelsträngen vorliegenden DNA der Lymphozyten.

Lösungen und Arbeitsschritte für die Hybridisierung

Lösungen

- | | |
|----------------|---|
| -20xSSC: | -88,4g NaCitrat |
| | -175,4g NaCl |
| | -in 800ml Aqua bidest bei 37°C lösen |
| | -pH auf 7,0 mit 1N HCl einstellen |
| | -auf 1000 ml auffüllen |
| | -autoklavieren |
| -70% Formamid: | -70ml Formamid |
| | -10ml 20xSSC |
| | -auf 100ml mit Aqua bidest auffüllen |
| | -pH auf 7,0 mit 1N HCl einstellen (ca. 500µl) |

Arbeitsschritte

- in 17µl Hybri-Mix (50% Formamid) 30min bei 37°C lösen

- mit Pipette mischen
- bei 70°C im Wasserbad 5min denaturieren
- 5min bei -20°C
- 30min bei 37°C vorinkubieren
- Objektträger in 70% Formamid 2min bei 70°C denaturieren
- 2min in 70% Ethanol (-20°C)
- je 2min in 85% und 100% Ethanol
- lufttrocknen
- Probe auf halben OT geben, zudeckeln und mit Fixogum verschließen
- in feuchter Kammer bei 37°C 2-4 Tage hybridisieren

4.2.5. Detektion

Die Deckgläser wurden vorsichtig entfernt. Um unspezifische Bindungen zu entfernen wurden die Objektträger bei 42° C in 50% Formamid/2x SSC und in 2x SSC jeweils für 10 min unter Schütteln gewaschen. Danach erfolgte eine Behandlung in 4xSSC bei Raumtemperatur für 5 min.

Unspezifische Bindungen des Avidins wurden durch Inkubation mit 5%BSA/4xSSC (100 µl pro Objektträger, zugedeckelt bei 37° C für 20 min in der feuchten Kammer) reduziert. Die Detektion erfolgte durch Auftragen einer Detektionslösung 5% BSA/4xSSC. Tween, Avidin-FITC und Anti-Digoxigenin-Rhodamin (100 µl pro Objektträger, mit einer Folie zugedeckt bei 37° C für 30 min in der feuchter Kammer inkubiert). Biotin wurde mit Avidin-FITC und Digoxigenin mit Anti-Digoxigenin-Rhodamin detektiert. Anschließend wurden nichtgebundene Anteile durch Waschen in 4xSSC-Tween-Puffer zweimal für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln entfernt. Nun wurden die Objektträger mit DAPI-Antifade eingedeckt, wodurch die Chromosomen gegengefärbt und die Bänderung sichtbar gemacht wird. Bei jeder Versuchsreihe wird eine Negativkontrolle mit amplifiziert und hybridisiert, wodurch sich eventuelle Verunreinigungen mit Fremd –DNA aufzeigen lassen (Saiki, Gelfand et al. 1988, Weiss, Hermsen et al. 1999).

Lösungen und Arbeitsschritte für die Detektion

Lösungen

- 50% Formamid: -250 ml Formamid
 -50ml 20xSSC
 -pH auf 7,0 mit 1N HCl einstellen
 -auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen
- 2xSSC: -50 ml 20xSSC auf 500ml mit Aqua bidest auffüllen
- 4xSSC/Tween: -100 ml 20xSSC
 -1ml Tween 20
 -pH mit 1N HCl einstellen
 -auf 500ml mit Aqua bidest auffüllen
- 5% BSA in 4xSSC/Tween: 0,5g BSA in 10ml 4xSSC/Tween lösen
im Kühlschrank lagern

Arbeitsschritte

- 2x 10min in 50% Formamid bei 42°C waschen (Schütteln)
- 1x 10min in 2xSSC bei 42°C waschen (schütteln)
- 2min in 4xSSC/Tween waschen (schütteln)
- 100µl 5% BSA/4xSSC/Tween auf OT geben, mit Folie eindecken, bei 37°C im Brutschrank in feuchter Kammer 20min inkubieren
- in 500µl 5% BSA/4xSSC/Tween 1µl Avidin-FITC (verd: 1.500) und 50µl Anti-Digoxigenin-Rhodamine (Verd: 1:10) geben, gut mischen
- 100µl davon pro OT auftragen, mit Folie zudecken und bei 37°C in feuchter Kammer im Brutschrank 30min inkubieren
- 2x 5min in 4xSSC/Tween bei Raumtemperatur waschen (schütteln, dunkel)
- ca. 20µl DAPI/Antifade (ONCOR) auftropfen, mit Deckglas (24x60) zudecken

4.2.6. Verstärkung

Um die Signale zu verstärken, wenn sie zu schwach sind wurde für die Tumor-DNA-Proben ein Antikörper gegen das Avidin, an dem wiederum Biotin gebunden ist (1:100 in 5%BSA/4xSSC), auf den Objektträger gegeben. Nach dem Waschen in 4xSSC/0,2 Tween (2x 5 min) erfolgte erneut eine Inkubation mit Avidin-FITC (100 µl pro Objektträger).

Für die Normal-DNA-Proben erfolgte die Verstärkung mit einem zweiten Antikörper. Nach Inkubation und zweimaligem Waschen in 4xSSC/0,2% Tween wurde der Antikörper gekoppelt mit Rhodamin auf den Objektträger gegeben.

Alle Inkubationen mit den entsprechenden Antikörpern wurden bei 37° C in der feuchten Kammer für 20 min durchgeführt.

Anschließend wurden die Objektträger zweimal 5 min in 4XSSC/0,2% Tween gewaschen und es erfolgte die Gegenfärbung mit 20µl DAPI/Antifade.

Arbeitsschritte für die Verstärkung

- Deckglas entfernen, kurz in 4xSSC/Tween waschen
- in 500µl 5% BSA/4xSSC/Tween 1µl Anti-Avidin-Biotin pro Objekträger geben, gut mischen
- 100µl pro OT auftragen, mit Folie zudecken, bei 37°C im Brutschrank in feuchter Kammer 20 min inkubieren
- 2x5 min in 4xSSC/Tween waschen(schütteln, dunkel)
- in 500µl 5% BSA/4xSSC/Tween 1µl Avidin-FITC geben, gut mischen
- 100µl pro OT auftragen, mit Folie zudecken, bei 37°C im Brutschrank in feuchter Kammer 20 min inkubieren
- 2x 5 min in 4xSSC/Tween waschen (schütteln, dunkel)
- ca. 20µl DAPI-Lösung auf OT auftragen, mit Glasdeckel zudecken

4.2.7. Auswertung, Dokumentation

Die Auswertung erfolgte mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop (Axioplan2, Carl-Zeiss.) und einem computergestützten, digitalen Bildanalysesystem der Firma Metasystems. Es wurden 15 Metaphaseplatten pro Fall mit einer CCD Kamera sowie einem FITC, TRITC und DAPI spezifischen Filtersystem aufgenommen.

Die Metaphaseplatten wurden nach der Aufnahme computergesteuert synchronisiert und ausgeglichen. Anschließend wurden die einzelnen Chromosomen mittels ISIS-Programm (In Situ Imaging System) voneinander getrennt und karyotypisiert. Die Signalstärken beider Farbstoffe entlang der Chromosomen werden miteinander verglichen und Imbalancen in Form von Deletionen oder Amplifikationen ermittelt.

15 Metaphasen werden gesucht und von jeder Metaphase 3 monochrome Bilder aufgenommen. Für die Bildaufnahme werden selektive Filtersätze für DAPI, FITC und TRITC eingesetzt (Bornfleth, Aldinger et al. 1996; Weiss, Hermesen et al. 1999).

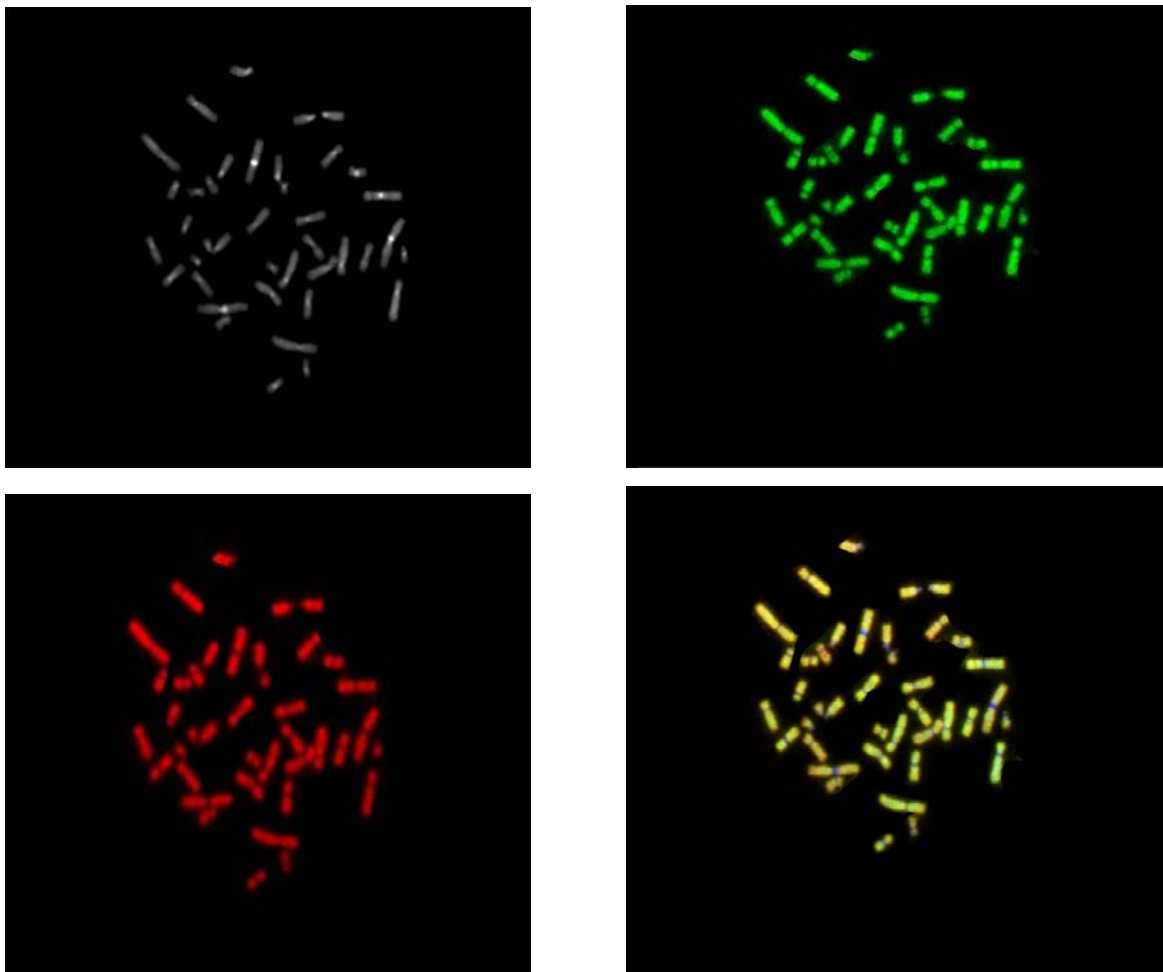


Abb. 5: Fluoreszenzbilder einer Metaphase eines chromophilen NZK

In der Abbildung 5 sind die 3 Fluoreszenzbilder einer Metaphase dargestellt. Es handelt sich um ein chromophiles Nierenzellkarzinom, pT1, G2.

Das DAPI-Bild dient zur Chromosomenidentifizierung, das FITC-Bild repräsentiert den Tumor, das TRITC-Bild stellt die normale DNA dar.

Während der Detektion wird das Verhältnis zwischen Rot und Grün gemessen. Das Überwiegen eines dieser Signale weist Zugewinne oder Verluste auf Seiten der Tumor-DNA auf. Im Rahmen der Amplifikationen ist die Tumor-DNA im Vergleich zur normalen DNA überpräsentiert und das grüne Fluoreszenzsignal stärker, und das rote Signal wird dominierend im Falle einer Deletion.

In den Abbildungen 6, 7 und 8 werden die Arbeitsschritte der Auswertung eines Tumors demonstriert

Abbildung 6 zeigt eine Metaphase eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms von pT1-Ausbreitung und Malignitätsgrad I.

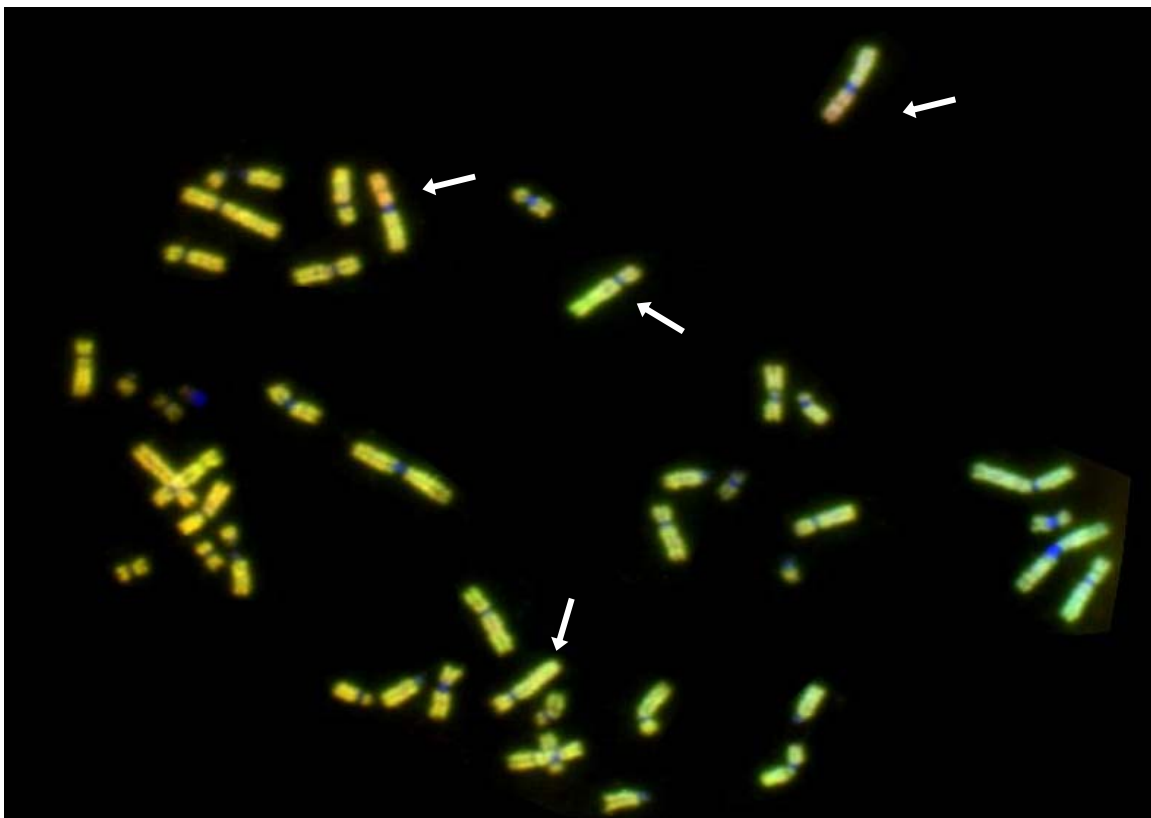


Abb. 6: Metaphase eines klarzelligen NZK

Die mikroskopische Aufnahme zeigt ein Überwiegen der roten Fluoreszenz auf dem kurzen Arm von Chromosom 3, was Verlust der Tumor-DNA anzeigt. Außerdem wird ein Überwiegen der grünen Fluoreszenz auf dem langen Arm des Chromosoms 5 dargestellt, was Zugewinne an Tumor-DNA anzeigt.

Die Chromosomen mehrerer (15 Aufnahmen) Metaphasenplatten wurden zuerst getrennt und anschließend entsprechend ihres Bandenmusters sortiert. Als Endresultat der Sortierung erhält man ein RATIO-Karyogramm, auch CGH-Karyogramm genannt. Hier werden bereits die charakteristischen Veränderungen dieses Tumors aufgezeigt. Abbildung 7 zeigt das Karyogramm desselben Tumors.

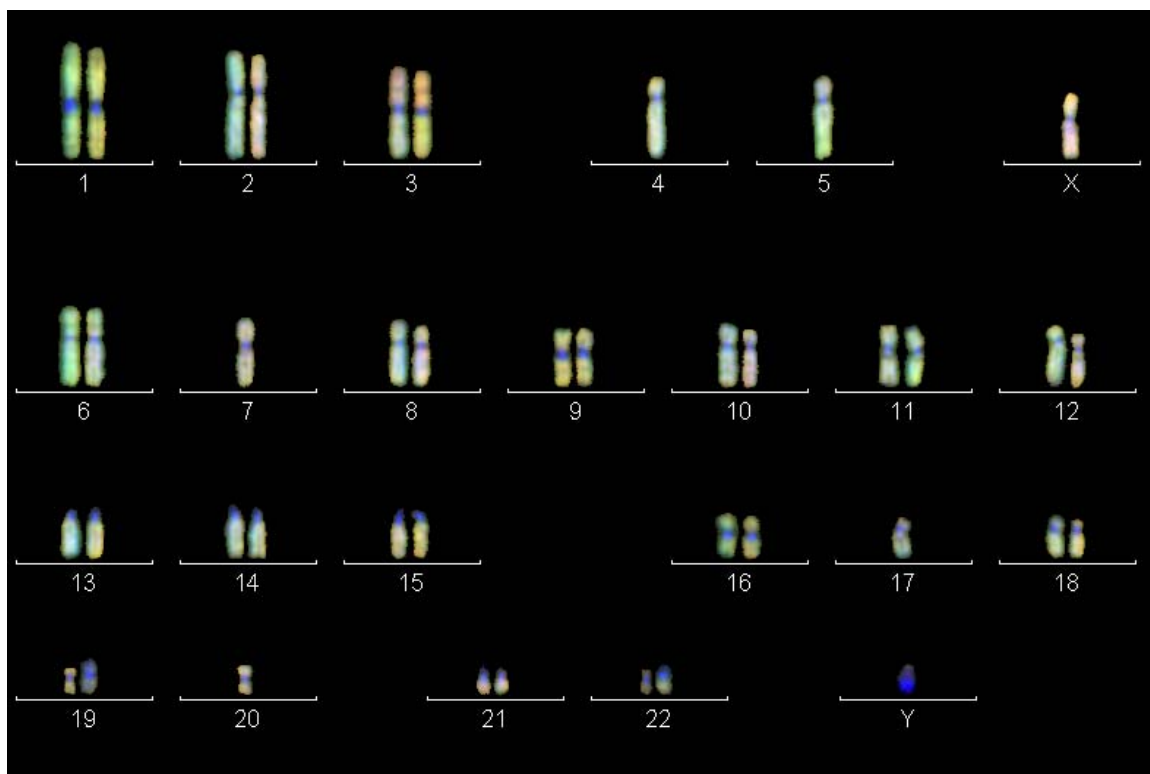


Abb. 7: CGH-Karyogramm des klarzelligen NZK aus Abb. 6

Zur Unterdrückung von Rauscheffekten und lokalen Artefakten muss über mehrere Metaphasen eines Falles gemittelt werden.

Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte computergestützt, die Software erstellte ein mittleres Fluoreszenzprofil der Karyogramme aller ausgewerteten Metaphaseplatten.

Im Falle einer Überrepräsentation von DNA-Sequenzen der Testprobe auf dem Chromosom kommt es zu einem Abweichen des Fluoreszenzprofils von der Normallinie nach rechts

oder bei einer Unterpräsentation von DNA-Sequenzen der Testprobe nach links. Bei fehlender genetischer Aberration der Tumor-DNA beträgt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten 1,0. Bei chromosomalen Zugewinnen kommt es an dem betroffenen Abschnitt zur Abnahme bzw. Zunahme des Rot-Grün-Verhältnisses um einen Kopiezahl von 0,5, so dass ein einfacher Zugewinn einem Wert von 1,5 entspricht (Trisomie), ein einfacher Verlust einem Wert von 0,5 (Monosomie).

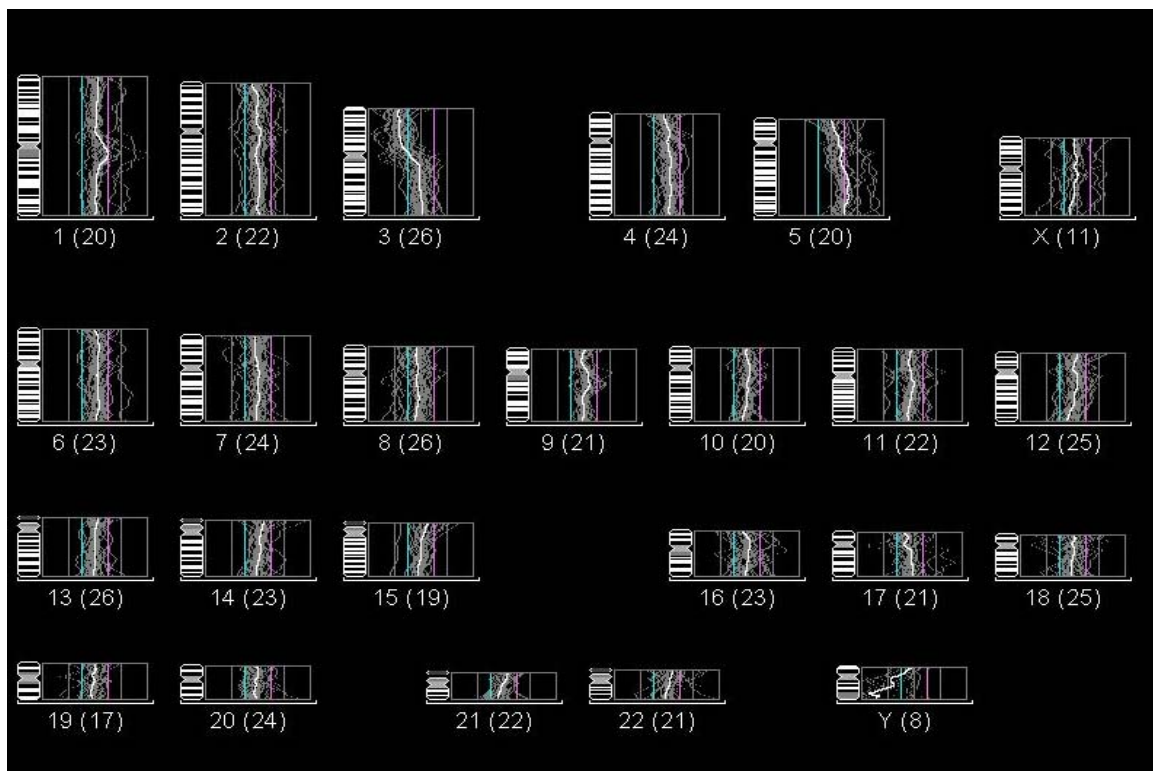


Abb.8: Das mittlere Fluoreszenzprofil aller ausgewerteten Metaphasenplatten desselben Tumors (KZ, NZK)

Abbildung 8 zeigt das mittlere Fluoreszenzprofil aller ausgewerteten Metaphasenplatten des klarzelligen NZK. Die in Klammern angegebene Zahl entspricht der Anzahl der ausgewerteten Chromosomen. Zugewinne und Verluste zeigen sich in einem Abweichen des Summenprofils von der Mittellinie in Richtung Grün oder Rot.

5. Ergebnisse

5.1. Pathohistologische Ergebnisse der Nierentumoren am Operationspräparat

Die histopathologische Evaluierung der Tumorpräparate erfolgte von Dezember 2001 bis Juli 2002. Diese basierte auf den Ergebnissen klassischer pathologischer Untersuchungstechniken wie Hämatoxyllin-Eosin(HE)-Färbung, Histo- und Immunhistochemische sowie Hale-Färbung und Elektronenmikroskopie. Die pathohistologische Bewertung der gesamten Präparate erfolgte im Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena nach der WHO-Klassifikation von 1997.

Die Tumore waren zwischen 2 und 20 cm groß im Durchmesser (Durchschnitt 4,9 cm), 30 Tumore waren kleiner als 4 cm, 20 Tumore waren größer als 4 cm im Durchmesser.

Die Geschlechtsverteilung von weiblichen zu männlichen Patienten betrug 2:3. Die Seitenverteilung von linksseitigen zu rechtsseitigen Nierentumoren betrug 21:29.

5.1.1. Klarzellige NZK

Makroskopisch finden sich mehrknotige braun-gelbe oder grau-gelbe meist solide, selten zystische Tumormassen. Die Tumorzellen sind mittelgroß bis groß und weisen optisch ein blaß eosinrotes bis aufgehelltes Zytoplasma auf. Die Kerne sind relativ isomorph und lassen nur geringe Größenunterschiede erkennen. Die Tumorzellen sind in kleinen alveolären Strukturen bzw. auch nestartigen Komplexen angeordnet. Siehe Abb. 9. (Störkel 1999; Cheville, Lohse et al. 2003).

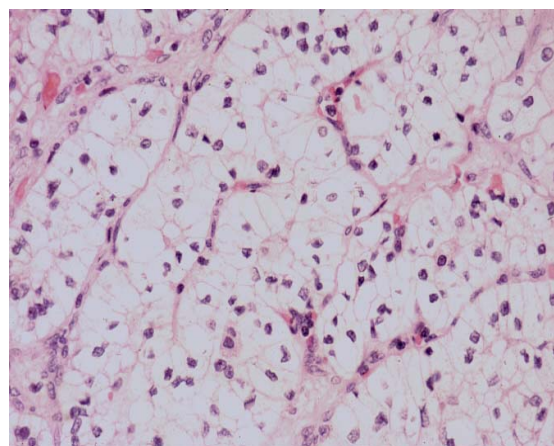
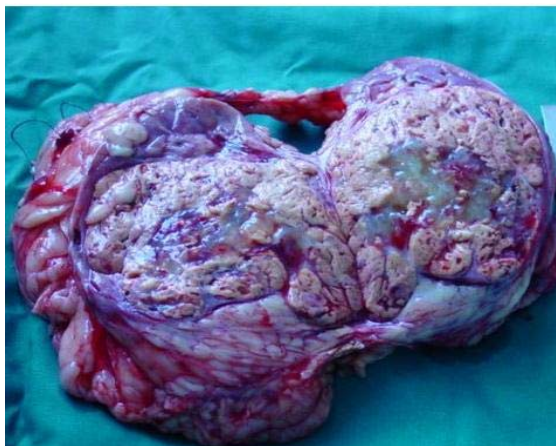


Abb.9: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen vom klarzelligen NZK

5.1.2. Chromophile NZK

Diese Karzinome lassen überwiegend braune Tumoren erkennen. Sie wachsen in soliden oder papillären bzw. tubulopapillären Formationen. Das Zytoplasma ist meist kräftig eosinophil. Die Zellkerne sind ovalär und rund gestaltet, meist mittelgroß. Siehe Abb. 10

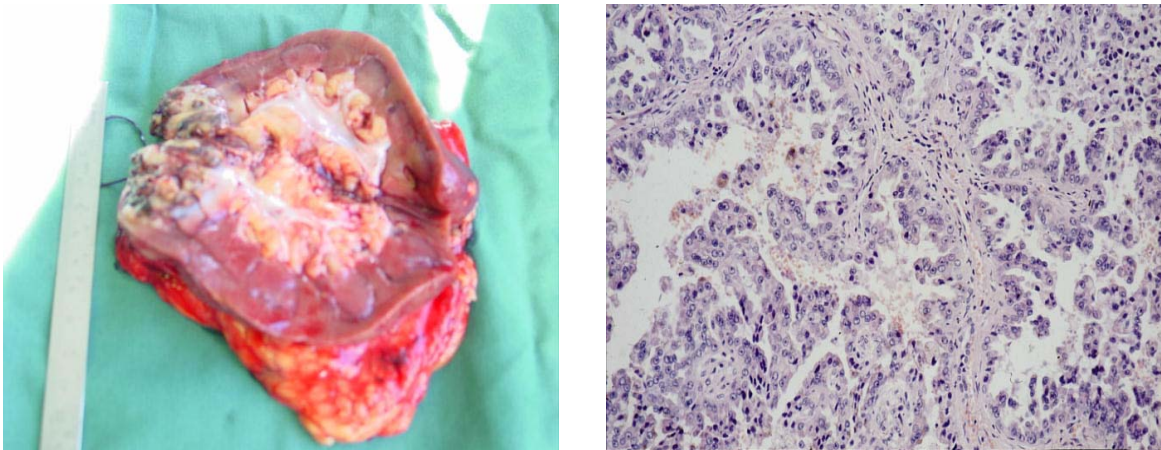


Abb. 10: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen vom chromophilen NZK

5.1.3. Chromophobe NZK

Die Tumoren sind unterschiedlich groß. Auf den Schnittflächen zeigt sich hellgraues, teilweise grau-gelbes tumoröses Gewebe. Mikroskopisch wird ein knotiger Aufbau beschrieben. Die Tumorzellen lassen deutliche Zellgrenzen und ein unterschiedlich dichtes, granuliertes, eosinophiles Zytoplasma erkennen. Siehe Abb. 11

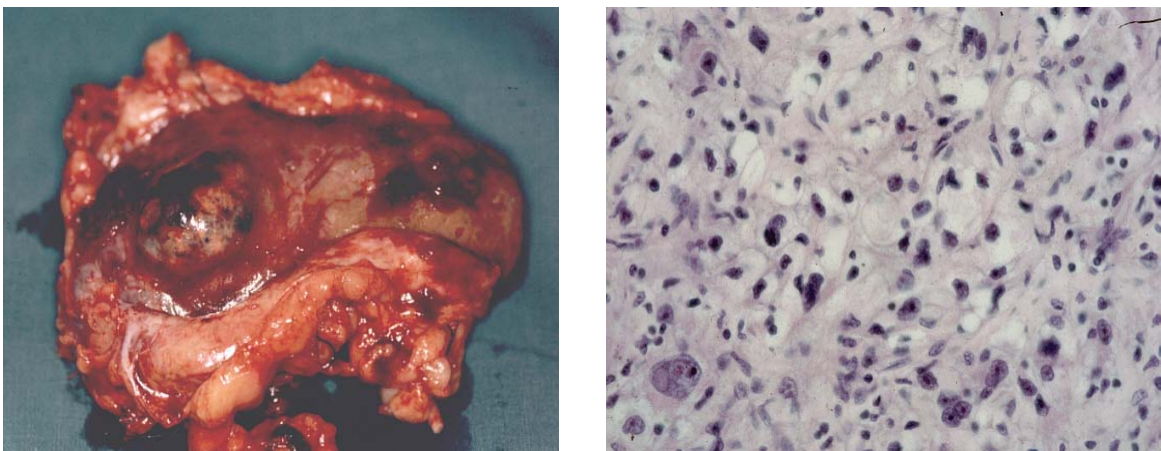


Abb. 11: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen vom chromophoben NZK

5.1.4. Onkozytome

Makroskopisch zeigen sich solide Tumoren mit grau-brauner, teilweise hellgrauer Schnittfläche. Mikroskopisch großleibige Zellen mit feinkörnig strukturiertem eosinophilem Zytoplasma. Die ovalären Kerne sind gering bis mäßig anisophorm und vielfach stellen sich doppelkörnige Tumorzellen dar. Das Wachsmuster ist überwiegend solid-trabekulär, sowie azinär und netzartig. Siehe Abb. 12

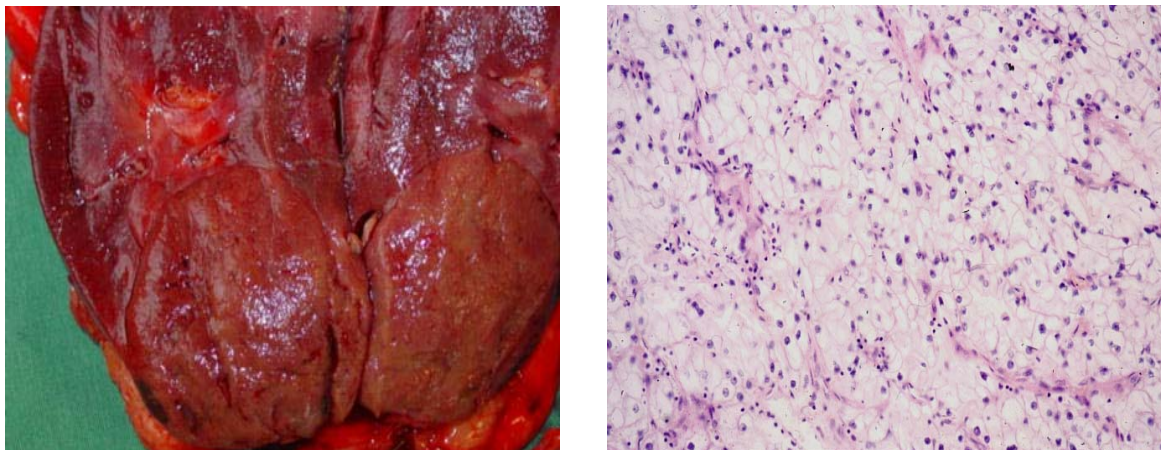


Abb. 12: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen vom Onkozytom

In der Tabelle 5 und Abbildung 13 sind die pathohistologischen Ergebnisse der untersuchten Nierentumoren dargestellt.

Tabelle 5: Pathohistologische Ergebnisse der untersuchten Nierentumoren:

Pathohistologische Klassifizierung	Anzahl	Tumornummer
- klarzelliges NZK, Grad I	8x	6, 7, 17, 18, 22, 27, 44, 49
- klarzelliges NZK, Grad II	29x	1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 21, 24, 25, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 45
- chromophiles NZK, kein Malignitätsgrad	3x	20, 34, 36
- chromophiles NZK, Grad II	3x	14, 35, 46
- chromophobes NZK, Grad II	2x	29, 50
- Onkozytome	4x	42, 43, 47, 48
- Urothelkarzinom, Grad II	1x	23

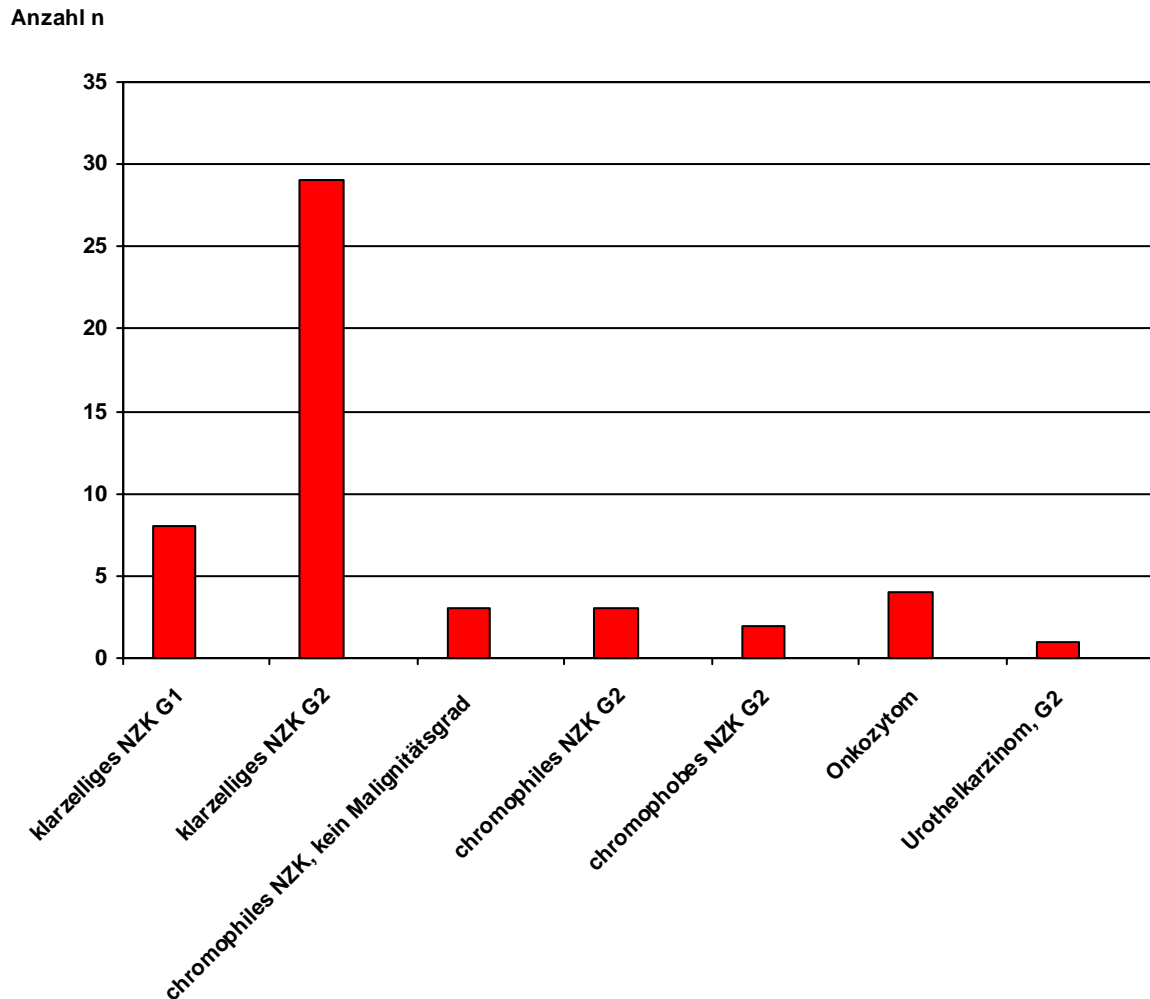


Abb.13: Graphische Darstellung der pathohistologischen Ergebnisse der Nierentumoren

5.2. Pathohistologische Ergebnisse der Nierentumorbiopsien

Wie bereits erwähnt sind alle Nierentumorbiopsien von einem Pathologen untersucht worden. Die Tumorgöße hat für die Materialgewinnung und die histologische Bewertung keine bedeutende Rolle gespielt. Die Biopsiepräparate wurden nummeriert und unabhängig von den Nierentumoren untersucht.

In 183 (73,2%) von den 250 untersuchten Biopsiepräparaten konnte der Pathologe eine Diagnose stellen. In den anderen 67 (26,8%) Präparaten war kein Tumormaterial auffindbar.

In 11 (22%) von 50 zentral entnommen Biopsien waren Nekrosen, Fibrosen und Nierengewebe mikroskopisch zu identifizieren, hier fand sich kein Tumormaterial. Bei den peripher entnommenen Biopsien von demselben Tumoren fand sich jedoch mindestens in einem Präparat eine tumoröse Veränderung, so dass in jedem dieser Tumoren eine histopathologische Charakterisierung erfolgen konnte.

Tabelle 6: Pathohistologische Ergebnisse der untersuchten Nierentumorbiopsien

Pathohistologische Klassifizierung	Anzahl	Tumornummer
- klarzelliges NZK, Grad I	3x	3, 7, 24
- klarzelliges NZK, Grad II	27x	1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 21, 25, 28, 30, 31, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 44, 45, 49, 50
- klarzelliges NZK, kein Malignitätsgrad	3x	6, 11, 22
- chromophiles NZK, Grad II	3x	14, 33, 46
- chromophobes NZK	3x	13, 26, 29
- andere Tumoren, (keine NZK)	6x	19, 20, 23, 27, 36, 39
- Onkozytome	4x	42, 43, 47, 48
- kein Tumor	1x	32

In Tabelle 6 und Abbildung 14 sind die pathohistologischen Ergebnisse der untersuchten Nierentumorbiopsien dargestellt. Hier wurde in mindestens einer von fünf Biopsien eines Tumors eine Diagnose gestellt. In Tumor Nr. 32 wurde in allen fünf Biopsien Nierenparenchym gefunden.

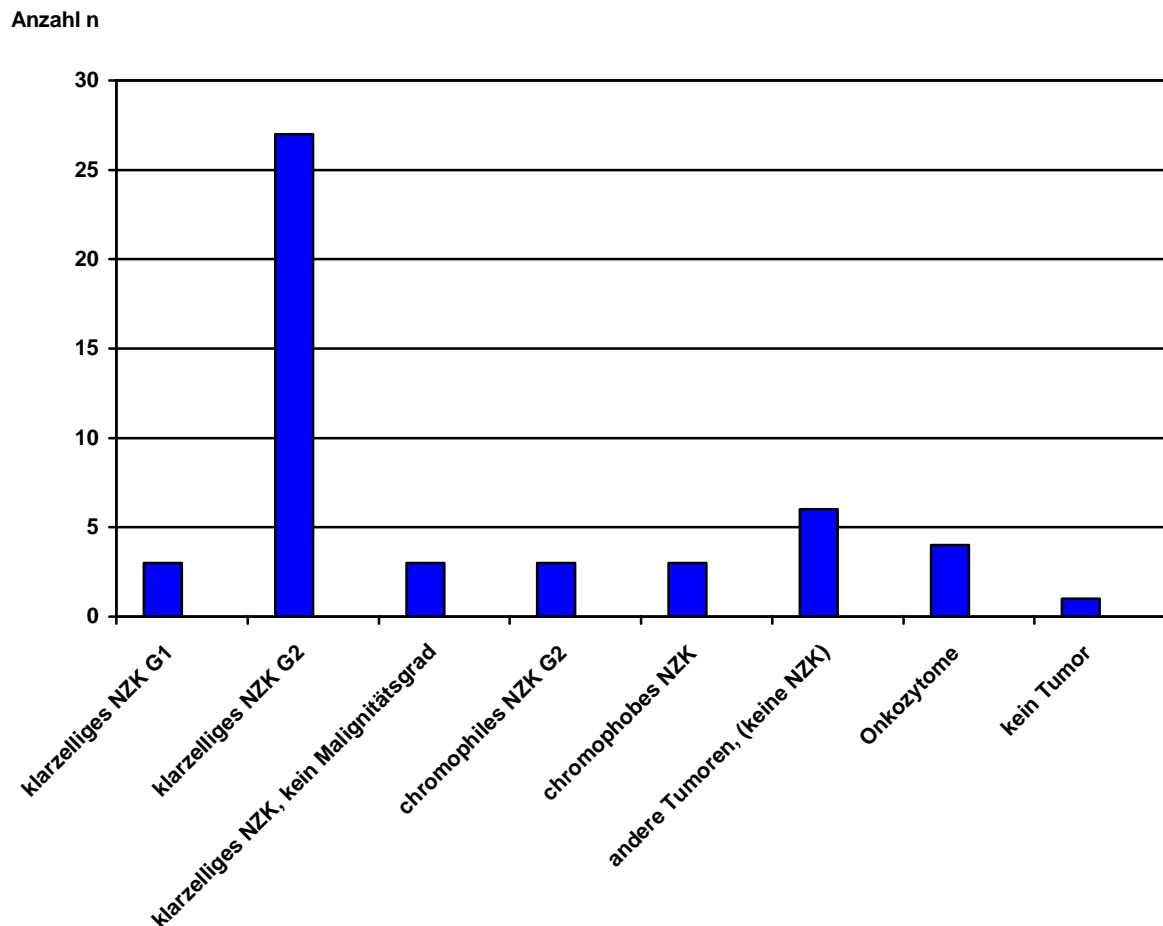


Abb. 14: Graphische Darstellung der pathohistologischen Ergebnisse der Nierentumorbiopsien

Die Tumorgöße lag zwischen 2 und 20 cm (im Durchschnitt 4,9 cm). Die Tumoren konnten nach ihrer Größe zwei Gruppen zugeordnet werden. In der ersten Gruppe waren 30 Tumoren bis 4 cm Größe, während in der zweiten Gruppe 20 Tumoren größer als 4 cm im Durchmesser waren.

In der ersten Tumorgruppe, lagen die Genauigkeit bezüglich der Malignität der zentralen Biopsie bei 83,3%, und die der peripheren Biopsie bei 75%. Während die Genauigkeit von beiden Biopsien zusammen bei 96,7% lag. In 5 von 30 zentralen Biopsien und in 30 von 120 peripheren Biopsien wurden nur Nekrose und/oder Fibrosen gefunden.

Die Genauigkeit in der zentralen und peripheren Biopsie zur Definition des Tumorausprungs (Differenzierung zwischen originären Nierentumoren und Metastasen) lag bei 96% bzw. 95,5%, zur Festlegung des Gratings bei 84% bzw. 84,4% und zur Definition des Tumortyps bei 87,5% bzw. 89,5. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Anzahl und Genauigkeit der Biopsien bei Tumoren bis 4 cm Durchmesser

	Zentrale Biopsie		Periphere Biopsie	
	Anzahl	Genauigkeit	Anzahl	Genauigkeit
Tumorbiologie (maligne/benigne)	25/30	83.3%	90/120	75%
Tumorursprung	24/25	96%	86/90	95,5%
Grading	21/25	84%	76/90	84.4%
Tumortyp/Wuchsmuster	21/24	87.5%	77/86	89.5%

In der zweiten Gruppe konnte die Malignität des Tumors durch eine zentrale Biopsie in 70% und in 66,25% durch eine periphere Biopsie definiert werden.

In 6 der zentralen Biopsien und in 27 der 80 peripheren Biopsien wurden nur Nekrosen und/oder Fibrosen gefunden. Bei der Berechnung mit 3 Biopsien aus jedem Tumor in dieser Gruppe, erhöht sich die Genauigkeit der Biopsie bezüglich der Tumorbiologie bis 95% (19/20 Fälle).

Die Genauigkeit der zentralen und peripheren Biopsien zur Definition des Tumorursprungs lag bei 100% bzw. 98,1%, zur Festlegung des Gratings bei 85,7% bzw. 94,3% und zur Definition des Tumortyps bei 71,4% bzw. 88,7%. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Anzahl und Genauigkeit der Biopsien bei Tumoren größer als 4 cm Durchmesser

	Zentrale Biopsie		Periphere Biopsie	
	Anzahl	Genauigkeit	Anzahl	Genauigkeit
Tumorbiologie (maligne/benigne)	14/20	70%	53/80	66,25%
Tumorursprung	14/14	100%	52/53	98,1%
Grading	12/14	85,7%	50/53	94.3%
Tumortyp/Wuchsmuster	10/14	71.4%	47/53	88.7%

5.3. Genetische Ergebnisse

Die Chromosomenanalyse wurde an 100 Biopsien durchgeführt. Hier wurden 20 Tumore (14x klarzelliges NZK, 3x chromophiles NZK, 2x chromophobes NZK und 1x Onkozytom) untersucht. Aus jedem Tumor wurden 5 Biopsien entnommen und genetisch analysiert. 33 Biopsien enthielten kein Tumormaterial, so dass die Chromosomenanalyse dieser Präparate keine genetischen Aberrationen zeigte.

Eine erfolgreiche Analyse mittels CGH konnte in 67 der 100 (67%) untersuchten Proben durchgeführt werden. Es war nicht immer möglich, in allen Arealen des jeweiligen Tumors ein Ergebnis zu erzielen.

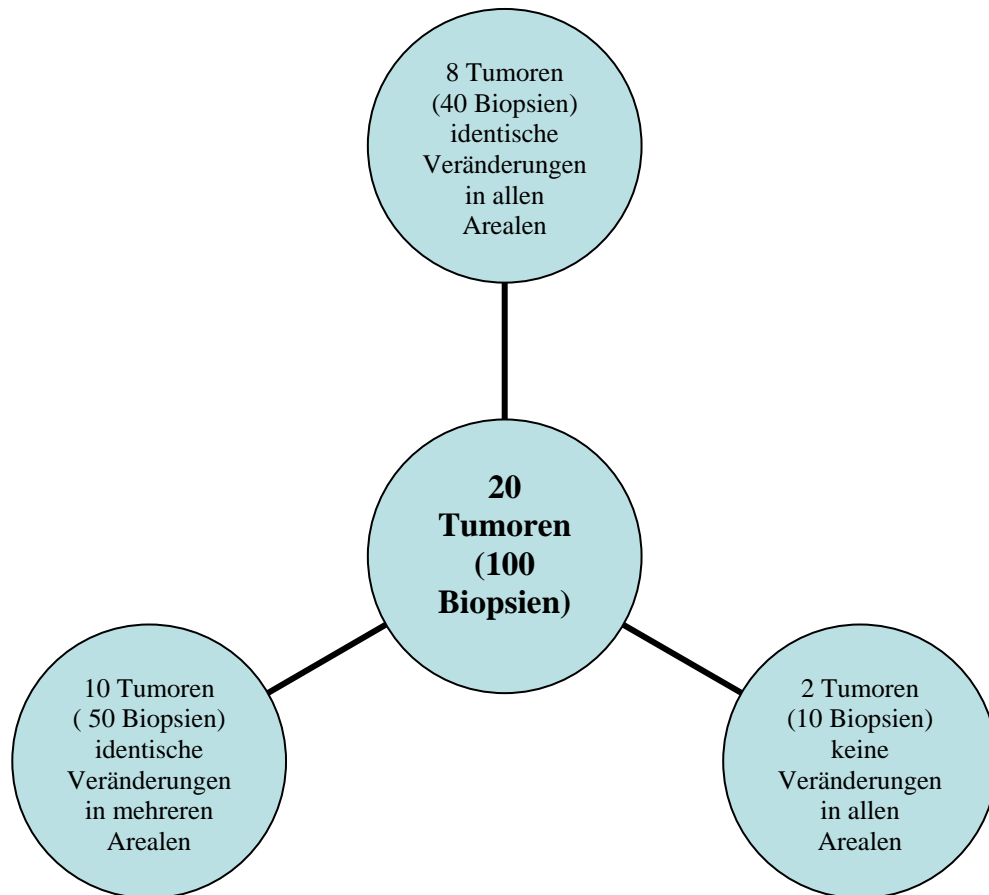


Abb.15. Genetische Veränderungen in allen untersuchten Biopsien

In 8 Fällen (40 Biopsien) traten in allen Arealen des jeweiligen Tumors identische Veränderungen auf. In 10 Fällen (50 Biopsien) konnten gleiche genetische Veränderungen in mehreren Arealen eines Tumors festgestellt werden. In 2 Fällen (10 Biopsien) war in allen Tumorarealen keine Veränderung feststellbar. In der Abbildung 15 ist die Häufigkeit genetischer Aberrationen in den Biopsien dargestellt.

5.3.1. Häufigkeit einzelner Chromosomenaberrationen

Am häufigsten traten Aberrationen am Chromosom 3 auf (73%). Dies waren Deletionen, strukturelle Veränderungen, die zu partieller Deletion des Chromosoms 3 führten sowie der Verlust des gesamten Chromosoms. Die Bruchpunkte bei den strukturellen Alterationen lagen im Bereich 3p14 und 3p21.

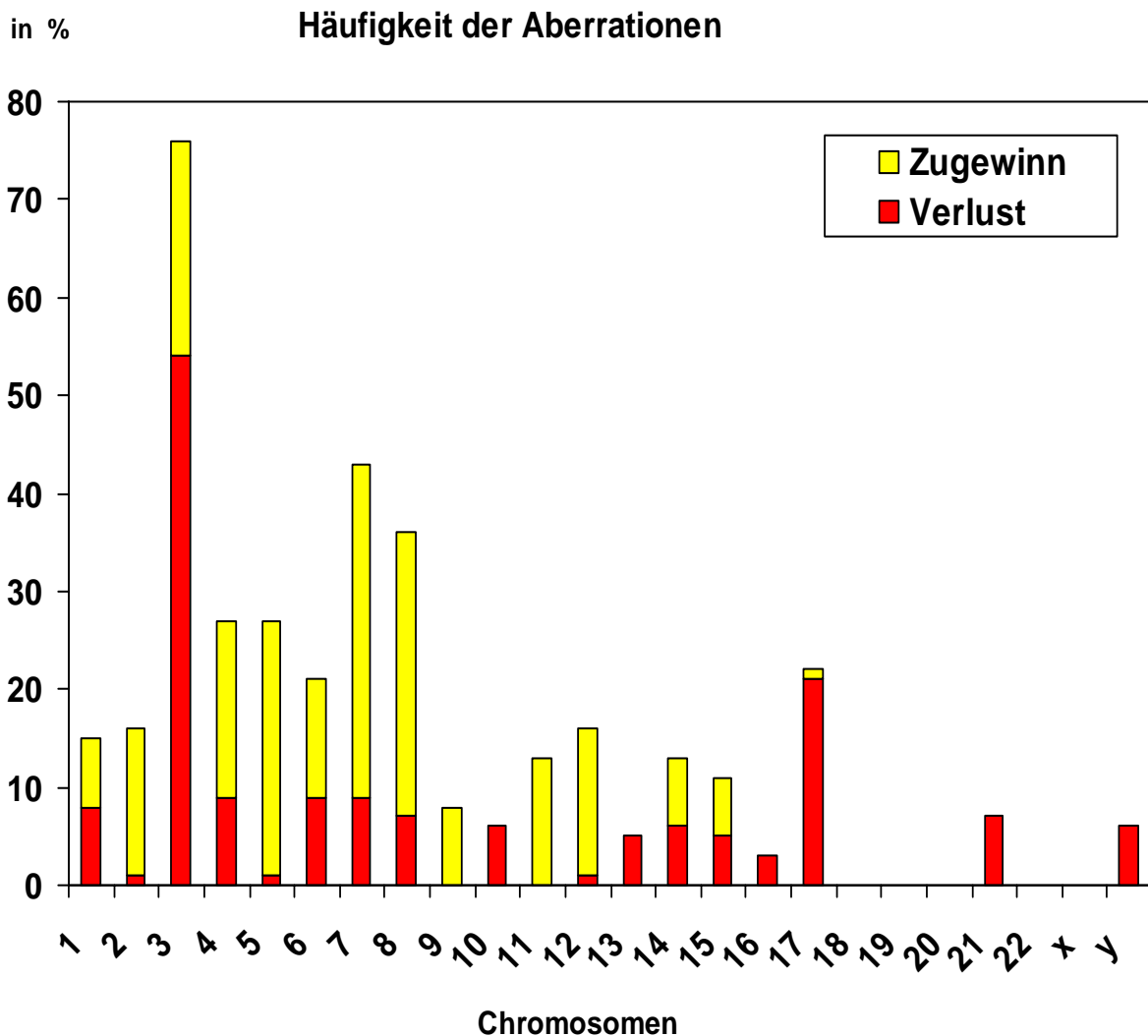


Abb. 16: Prozentuale Verteilung von Chromosomenaberrationen unabhängig vom Tumortyp (n=67)

Weiterhin zeigten sich Veränderungen am Chromosom 14 (25%). Hier handelt es sich häufiger um Monosomien und seltener um Trisomien.

Tri- und Tetrasomie des Chromosoms 7 waren ein weiterer häufiger Befund (48%).

Am Chromosom 8 traten Verluste im Bereich 8p (9%) sowie Zugewinne im Bereich 8q (28%) auf.

Weiterhin wurden Veränderungen (häufig Deletionen) am Chromosom 6 beobachtet (27%).

Für das Chromosom 5 wurden vorwiegend strukturelle Veränderungen, wie partielle Trisomie im Bereich 5q21qter sowie Tri- und Tetrasomie gefunden (28%). Am Chromosom 9 waren überwiegend Monosomien (9%) und am Chromosom 4 überwiegend Trisomien (25%) zu finden. Am Chromosom 1 traten Monosomien sowie Trisomien auf (14%).

In der Abbildung 16 wird die Prozentuale Verteilung von Chromosomenaberrationen (n=67) dargestellt.

5.3.2. Chromosomenaberrationen bei unterschiedlichen Zelltypen

5.3.2.1. Klarzelltyp

70% (14/20) der genetisch untersuchten Karzinome waren histopathologisch als klarzellige Nierenzellkarzinome definiert. In diesen Tumoren traten Veränderungen am Chromosom 3 auf. Diese waren strukturelle Veränderungen im kurzen Arm im Bereich 3p14 und 3p21 bzw. Monosomien (in 36 Tumoren). Die strukturellen Alterationen stellten sich als Deletionen des gesamten Chromosoms dar (in 6 Tumoren). Weiterhin trat der Verlust des Chromosoms 14 bzw. Deletion im Bereich 14q22qter (in 4 Tumoren) auf. Am Chromosom 5 wurden häufig strukturelle Veränderungen im Sinne einer partiellen Trisomie 5q21pter sowie Tri- und Tetrasomie des gesamten Chromosoms 5 in 16 Tumoren gefunden. Weiterhin waren wiederum Verluste der Chromosomen 6 (in 3 Tumoren) und 8 (in 12 Tumoren) nachweisbar.

In der Abbildung 17 wird die Häufigkeit der Chromosomenaberrationen der klarzelligen Nierenzellkarzinome dargestellt.

Anzahl der Tumoren

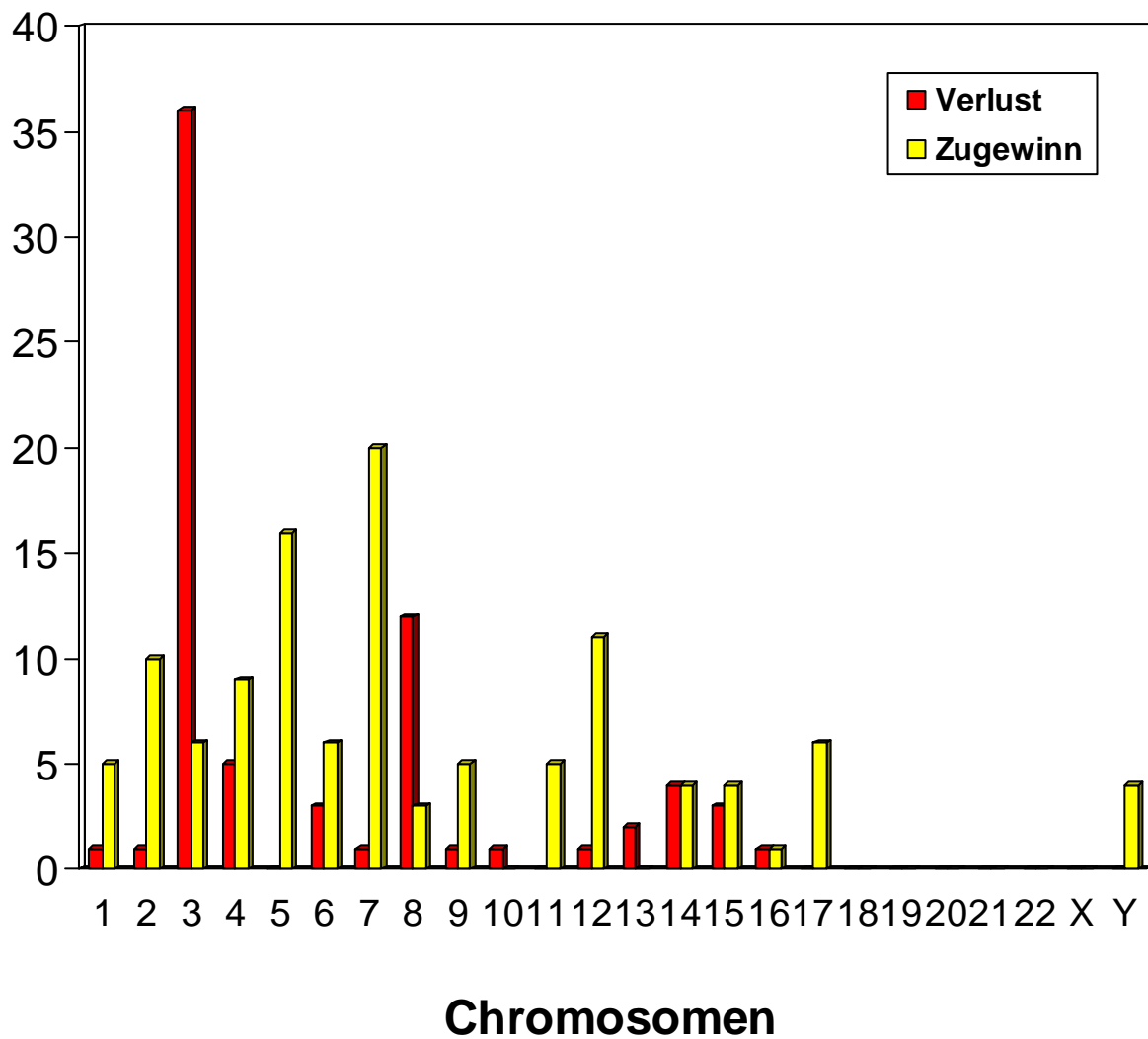


Abb. 17: Häufigkeit der Chromosomenaberrationen der klarzelligen NZK

5.3.2.2. Chromophile Nierenzellkarzinome

Bei 11 der 15 (73,3%) untersuchten chromophilen Tumorbiopsien konnten chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden. Hier fanden sich Zugewinne der Chromosomen 7, 8 sowie 5q und 17q. Außerdem traten unterschiedliche Veränderungen auf, wie Zugewinn der Chromosomen 9 und 11, sowie Verlust an den Chromosomen 1, 6, 10, 17 und 21.

In der Tabelle 9 sind die chromosomalen Veränderungen in den Präparaten des chromophilen Nierenzellkarzinoms zusammengefasst.

Tabelle 9: Chromosomale Veränderungen in den chromophilen NZK

Fall-Nr.	Chromosomale Aberrationen
2-I	-1,-6,-10,-17,-21
2-II	-1,-6,-10,-17,-21
2-III	-17
2-IV	-1,-6,-10,-17,-21
2-V	-1,-6,-10,-17,-21
8-I	+5q,6p,7?,8q,9,11
8-II	+6p,8q
8-III	+6p,7,8q,17q,-17p
8-IV	+6p,7,8q,17q,-17p
8-V	+6p,7,8?
14-I	Keine Veränderung
14II	+5q,-16q
14-III	Keine Veränderung
14-IV	Keine Veränderung
14-V	Keine Veränderung

5.3.2.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome

Bei 3 der 10 untersuchten chromophoben Tumorbiopsien fand sich hauptsächlich eine Monosomie am Chromosom 17 sowie am Chromosom 8p. Zugewinne gab es am Chromosom 4q und 5q. In den 7 anderen untersuchten Präparaten waren keine chromosomalen Veränderungen zu verzeichnen.

In der Tabelle 10 sind die chromosomalen Veränderungen in den Präparaten der zwei chromophoben Nierenzellkarzinome zusammengefasst.

Tabelle 10: Chromosomale Veränderungen in den chromophoben NZK

Fall-Nr.	Chromosomale Aberrationen
12-I	+4q,5q,-8p,17
12-II	Keine Veränderung
12-III	Keine Veränderung
12-IV	+4q,5q,8q,-8p?,9q22,-17
12-V	+4q,5,6q,-8p,17
13-I	Keine Veränderungen
13-II	Keine Veränderungen
13-III	Keine Veränderungen
13-IV	Keine Veränderungen
13-V	Keine Veränderungen

5.3.2.4. Onkozytome

In 4 von 5 untersuchten Onkozytom-Biopsien waren Zugewinne an den Chromosomen 11, 7q sowie Verluste an den Chromosomen 20q und 16, in einer Biopsie war keine Veränderung zu erkennen. In der Tabelle 11 sind die chromosomalen Veränderungen in den 5 Präparaten des Onkozytoms dargestellt.

Tabelle 11: Chromosomale Veränderungen im Onkozytom

Fall-Nr.	Chromosomale Aberrationen
10-I	+11,+7q31qter
10-II	+11,+7q31qter,-20q
10-III	+11,+7q31qter
10-IV	+11,+7q,-16
10-V	Keine Veränderung

In den Abbildungen 18, 19, 20 und 21 sind die chromosomalen Veränderungen am mittleren Fluoreszenzprofil unterschiedlicher Tumortypen dargestellt.



Abb. 18: Tumor Nr. 11-I (zentrales Areal, klarzellig), mit chromosomalen Aberrationen (-3p14p,-21,-17, und +2q, +3q,+4q,+5,+6q,+7,+8q,+12,+15q). Rote Pfeile für Zugewinne, blaue Pfeile für Verluste



Abb. 19: Tumor Nr. 14-II (peripheres Areal, chromophil), mit chromosomalen Aberrationen (-1,-6,-10,-17,-21). Blaue Pfeile für Verluste.



Abb. 20: Tumor Nr.12-IV (peripheres Areal, chromophob) mit chromosomalen Aberrationen (-8p? -9q22qter, -17 und +4q, +5q, +8q). Rote Pfeile für Zugwinne, blaue Pfeile für Verluste



Abb. 21: Tumor Nr. 10-I (zentrales Areal, Onkozytom) mit chromosomalen Aberrationen (+7q31qter). Roter Pfeil für Zugewinn

5.3.3. Differenzierung der Chromosomenaberrationen nach Malignitätsgrad

Die Differenzierung der Chromosomenaberrationen erfolgte nur bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Bei der geringen Anzahl der chromophilen und chromophoben NZK war eine Differenzierung nicht repräsentativ.

Tumoren mit einem Malignitätsgrad G1 zeigten am häufigsten Deletionen am Chromosom 3 und am Chromosom 14 sowie eine Trisomie des Chromosoms 7.

Bei den Tumoren mit Malignitätsgrad G2 traten am häufigsten Deletionen am Chromosom 3 bzw. der Verlust des gesamten Chromosoms auf. Eine Deletion des Chromosoms Y war auch feststellbar. Außerdem war eine Trisomie des Chromosoms 7 nachweisbar.

Es waren keine Tumore mit Malignitätsgrad 3 in dieser Studie, so dass eine Differenzierung nicht möglich war.

5.4. Vergleich der pathohistologischen Ergebnisse der Nierentumore mit den pathohistologischen Ergebnissen der Nierentumorbiopsien

Bei dem Vergleich der pathohistologischen und genetischen Befunde der Biopsien mit den Diagnosen am Operationspräparat kam es zu folgenden Ergebnissen:

Histologisch gab es bei den 100 histopathologisch und genetisch untersuchten Tumorbiopsiepräparaten 44 Übereinstimmungen und 56 falsche Diagnosen:

In 70 der untersuchten klarzelligen Biopsiepräparate (14 Tumore) wurden 38 Übereinstimmungen (54%) festgestellt. In 15 chromophilen Biopsiepräparaten (3 Tumore) waren keine Übereinstimmungen (0%) und in 10 chromophoben Biopsiepräparaten (2 Tumore) waren es nur 2 (20%). In den 5 Biopsiepräparaten (1x Onkozytom) waren 4 Übereinstimmungen (80%) zu verzeichnen.

In der Abbildung 22 wird der Vergleich der Ergebnisse dargestellt.

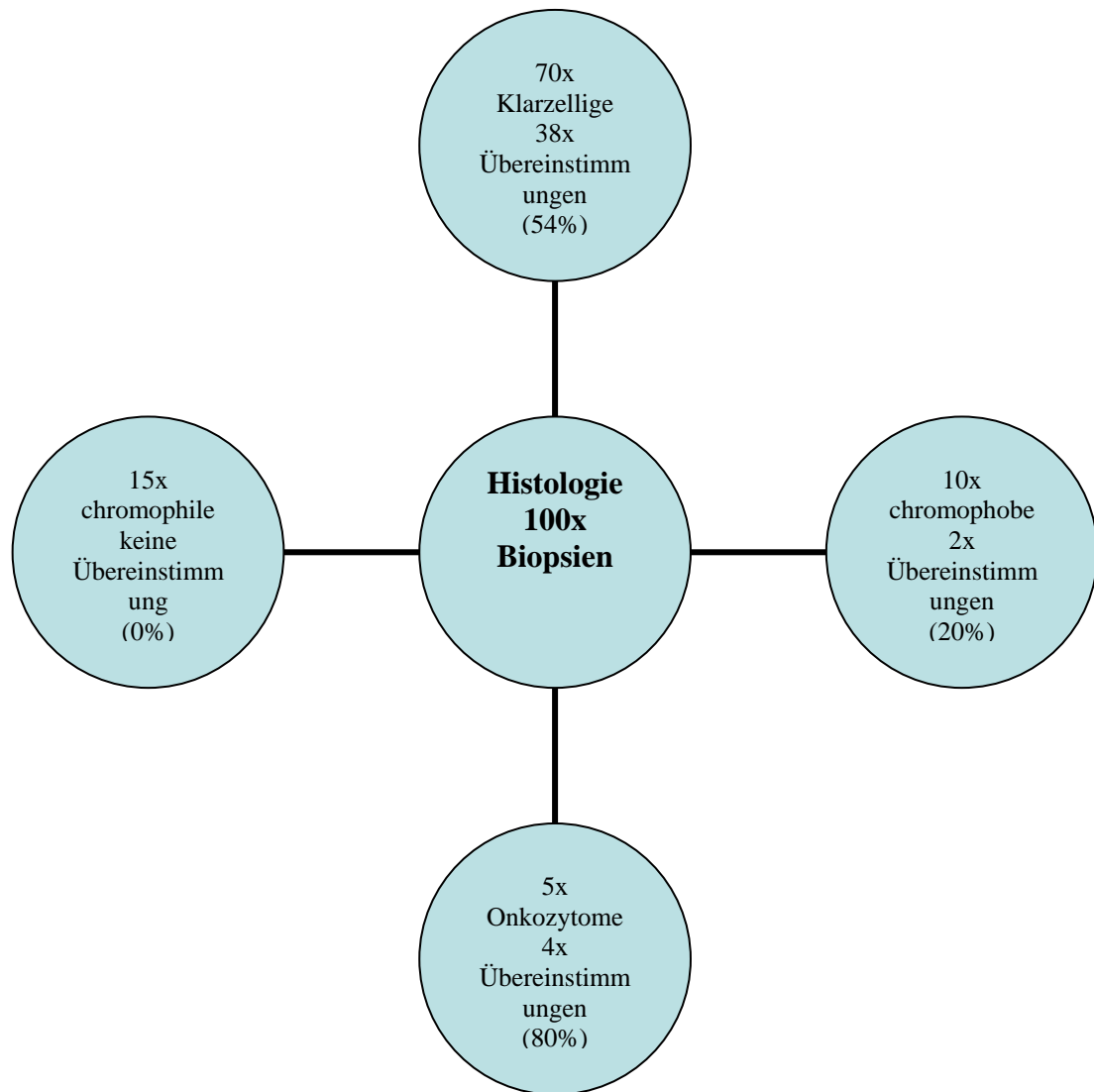


Abb.22: Vergleich der pathohistologischen Ergebnisse der Biopsien mit der Diagnose im Haupttumor des Operationspräparates.

5.5. Vergleich der genetischen Analysen der Biopsien mit der pathohistologischen Diagnose des Operationspräparates.

Genetisch fanden sich in denselben 100 Tumorbiopsiepräparaten, 50 Übereinstimmungen und 50 Diskrepanzen;

In 70 der untersuchten klarzelligen Biopsiepräparate (14 Tumoren) wurden 45 Biopsiepräparate korrekt analysiert (64%). In 15 chromophilen Biopsiepräparaten (3 Tumore) waren es nur 5 (33%), in 10 chromophoben Biopsiepräparaten (2 Tumore) nur 2

(20%). In 5 Biopsiepräparaten (1x Onkozytom) war keine richtige Analyse (0%) möglich. Der Vergleich der Ergebnisse wird in der Abbildung 23 dargestellt.

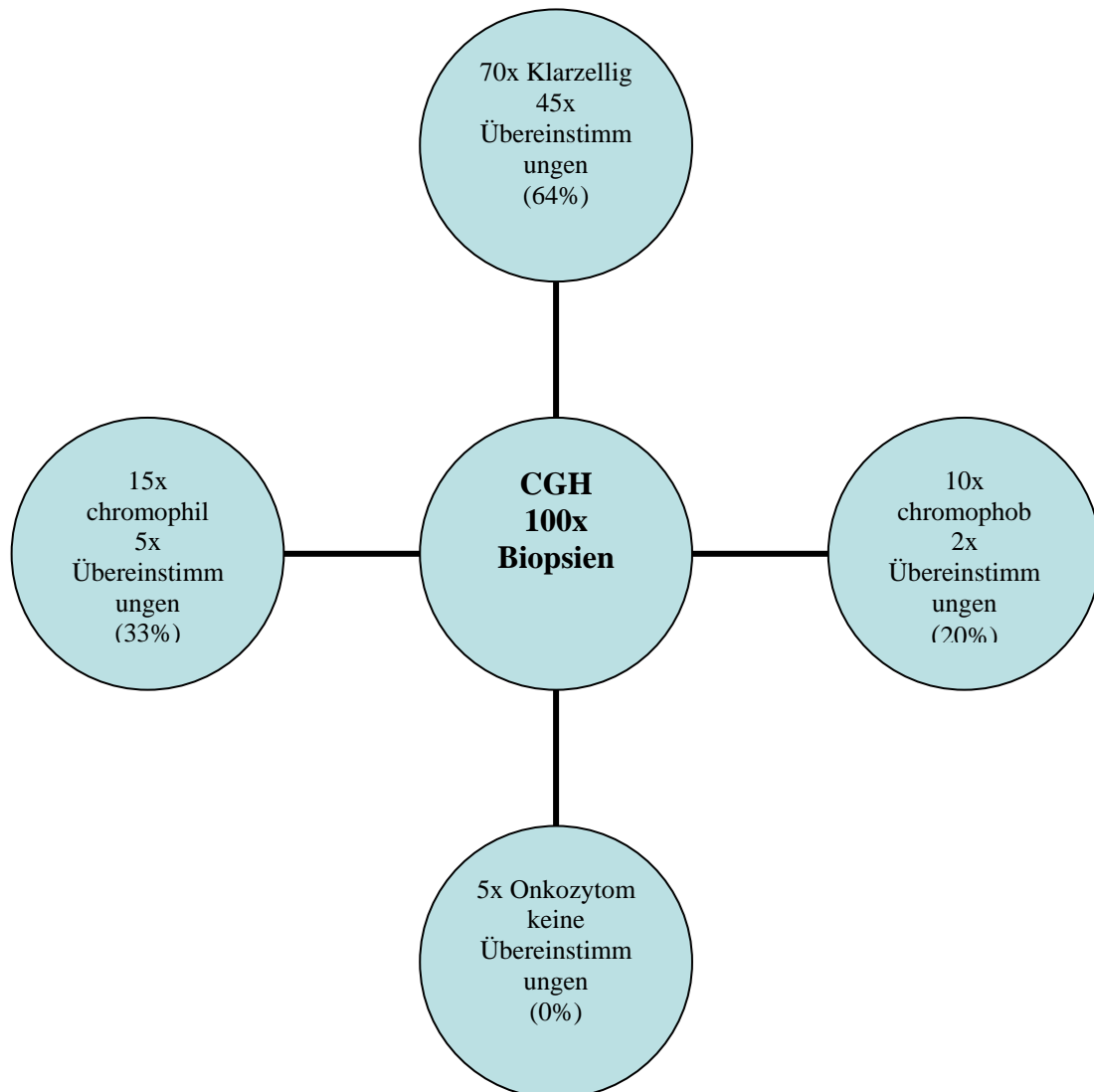


Abb.23: Vergleich der genetischen Analysen der Biopsien mit der pathohistologischen Diagnose im Haupttumor des Operationspräparates.

Bei den 20 untersuchten Tumoren konnte mit Hilfe der genetischen Analyse und der histologischen Untersuchung eine Übereinstimmung mit der Diagnose im Haupttumor in 18 Tumoren festgestellt werden.

6. Diskussion

Wie bereits aufgeführt, ist die präoperative Abklärung der Dignität renaler Raumforderungen trotz zahlreicher moderner Diagnostikmethoden nicht immer möglich (Warshauer, McCarthy et al. 1988; Heidenreich and Ravery 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird die diagnostische Sicherheit der Feinnadelbiopsie durch die Auswertung histopathologischer und genetischer Untersuchungsverfahren diskutiert.

Moderne chirurgische Verfahren erlauben es, das lokal begrenzte kleine Nierenzellkarzinom sicher zu therapieren. Jedoch stellt sich bei diesen kleinen Tumoren aufgrund der bisherigen Einstufung bezüglich der Malignität, die Frage des operativen oder konservativen Vorgehens (Wunderlich, Dreihaupt et al. 2004).

Die partielle Nephrektomie bei Patienten mit kleinen Einzeltumoren ist in den letzten Jahren eine etablierte therapeutische Maßnahme geworden (Wunderlich, Reichelt et al. 1998, Schlichter, Wunderlich et al. 1999). Bei diesem chirurgischen Verfahren besteht jedoch die Gefahr des lokalen Rezidivs in der Restniere. Das Risiko eines Lokalrezidives nach partieller Nephrektomie beträgt bis zu 10% (Van Poppel 2003). Dies kann an der unvollständigen Resektion oder Multifokalität des Nierentumors liegen. In dieser Situation ist in den meisten Fällen eine radikale Nephrektomie notwendig.

Andererseits gibt es alternative, teilweise noch experimentelle Behandlungsmethoden der kleinen Nierentumoren wie die Kryo- und Thermoablation, die Hochfrequenzablation, der hochfokussierte Ultraschall, die Äthanolablation und die Mikrowellen- Koagulation (Gill, Novick et al. 1998; Hsu, Fidler et al. 2000; Rendon, Kachura et al. 2002; Desai and Gill 2002; Sewell, Howard et al. 2003; Zlotta, Wildschutz et al. 1997; Reddan, Raj et al. 2001). Die Vorteile dieser minimalinvasiven Therapiemethoden sind minimale Parenchymschädigung, die verringerte Morbidität, die Verkürzung des Krankenhausaufenthaltes und die niedrigen Kosten.

Die Risiken bzw. die Nebenwirkungen einer Feinnadelbiopsie sind als gering einzuschätzen. Smith et al. berichteten über 665 Nierentumorbiopsien an 288 Patienten ohne wesentliche Komplikationen. In 9-11% wurden hauptsächlich postoperative Flankenschmerzen und die Entwicklung von subkapsulären Hämatomen beobachtet, die jedoch immer konservativ beherrscht werden konnten. Biopsiebedingte Tumorzellausbreitungen oder andere, lebensgefährliche Nebenwirkungen im

Zusammenhang mit der Biopsie wurden nicht erwähnt (Lechevallier, Andre et al. 2000; Smith 1991; Preda, Van Dijk et al. 2003).

Die klinische Bedeutung der vorgelegten Untersuchung liegt in der Möglichkeit, die relativ seltenen benignen Nierentumoren, deren Dignität derzeit präoperativ nicht abschätzbar ist, minimalinvasiv diagnostizieren zu können. Erste Studien zur perkutanen Feinnadelbiopsie der kleinen Nierentumoren (meistens CT-gesteuert) zeigten eine hohe Inzidenz bei gutartigen Tumoren an (Neuzillet, Lechevallier et al. 2004, Smith 1991, Johnson, Nazarian et al. 2001).

Die Auswertung der Genauigkeit der Feinnadelbiopsie der Nierentumoren erfolgte nach radikaler und partieller Nephrektomie pathohistologisch und genetisch. Eine Studie über die präoperative Diagnostik mittels Feinnadelbiopsie läuft seit 2004 in der Urologischen Klinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

6.1. Pathohistologische Ergebnisse der Nierentumorbiopsien

In einem von 50 Tumoren (2%) war die Tumorbiologie nicht definierbar. In 49 Fällen (98%) konnte anhand des Biopsiematerials zwischen malignen und benignen Tumoren unterschieden werden. In 3 Fällen (6%) war es nicht möglich, den Ursprung des Tumors zu definieren. In 85,2% war das Grading in der histopathologischen Auswertung des Biopsiegewebes korrekt definiert. In unserer Biopsie-Reihe wurden gutartige Läsionen aufgedeckt (8%, alles Onkozytom). Das klinische Management bei diesen Patienten hätte im Falle der präoperativ durchgeführten Biopsie anders sein können.

Hara et al. berichteten über 15 Patienten, die wegen malignen Nierentumoren einer chirurgischen Therapie unterzogen wurden. Die histopathologischen Diagnosen von dem Biopsiematerial und von dem chirurgischen Präparat waren in 13 Fällen identisch. Diese Ergebnisse sind denen anderer Autoren ähnlich, die die Aussage der perkutanen Biopsie der Nierentumoren auswerten. So berichtete Wood et al. über 5 falsch-negative Biopsie-Ergebnisse in 79 Fällen.

Neuzillet et al. fand in einer Biopsie-Reihe 75% maligne Läsionen, wobei ein Nierenzellkarzinom in 5 falsch-negativen Biopsien gefunden wurde. Bei 51 anderen Patienten (95%) wurden die Biopsieergebnisse durch die histopathologischen Ergebnisse bestätigt (Wood, Khan et al. 1999; Neuzillet, Lechevallier et al. 2004; Hara, Miyake et al. 2001).

In ca. 85% der Biopsien wurde das Grading übereinstimmend definiert. 15% konnten nicht korrekt entsprechend den abschließenden histopathologischen Ergebnissen zugeordnet werden. Dies kann an der Heterogenität der Tumoren liegen. Herts und Bäcker berichteten über eine gute Übereinstimmung des Grading zwischen der Biopsie und der abschließenden histopathologischen Evaluierung (Herts and Baker 1995).

Die Tumorgöße lag zwischen 2 und 20 cm (4,9 cm). Die Tumoren wurden nach ihrer Größe zwei Gruppen zugeordnet. In der ersten Gruppe waren 30 Tumoren bis 4cm Größe, in den zweiten 20 Tumoren größer als 4 cm im Durchmesser.

In der ersten Tumorgruppe lagen die Genauigkeit der zentralen Biopsie bezüglich der Malignität bei 83,3% und die Genauigkeit der peripheren Biopsie bei 75%. Die Genauigkeit von beiden Biopsien zusammen lag bei 96,7%.

In 5 von 30 zentralen Biopsien und in 30 von 120 peripheren Biopsien wurden nur Nekrosen und/oder Fibrosen gefunden. Die Genauigkeit der zentralen und peripheren Biopsien zur Definition des Tumorursprungs (Differenzierung zwischen originären Nierentumoren und Metastasen) lag bei 96% bzw. 95,5%, zur Festlegung des Gradings bei 84% bzw. 84,4% und zur Definition des Tumortyps bei 87,5% bzw. 89,5.

In der zweiten Gruppe konnte die Malignität des Tumors durch eine zentrale Biopsie in 70% und durch eine periphere Biopsie in 66,25% definiert werden.

In 6 der zentralen Biopsien und in 27 der 80 peripheren Biopsien wurden nur Nekrosen und/oder Fibrosen gefunden. Bei der Berechnung mit 3 Biopsien von jedem Tumor, in dieser Gruppe, erhöht sich die Genauigkeit der Biopsie bezüglich der Tumorbiologie bis 95% (19/20 Fälle). Die Genauigkeit der zentralen und peripheren Biopsien zur Definition des Tumorursprungs lag bei 100% bzw. 98,1%, zur Festlegung des Gradings bei 85,7% bzw. 94,3% und zur Definition des Tumortyps bei 71,4% bzw. 88,7%.

Nguyen berichtet über eine Erfolgsrate zwischen 87% und 100%. Leiman berichtet über Sensitivität und Spezifität von 92% und 94%. Nach aktuellen Literaturangaben liegt die Genauigkeit der Nierentumorbiopsie zwischen 85 % und 98 %. Hier wurden CT-gesteuerte (Neuzillet et al. 2004; Nadel, Baumgartner et al. 1986), und Ultraschallgesteuerte (Ohmori, Arimoto et al. 1990; Abe and Saitoh 1992; Hergesell, Felten et al. 1998; Christensen, Lindequist et al. 1995; Caoili, Bude et al. 2002; Kolb, Velosa et al. 1994) Nierentumorbiopsien durchgeführt und ausschließlich histologisch ausgewertet.

Anhand unserer Ergebnisse sollte bei Tumoren bis 4 cm im Durchmesser eine zentrale und eine periphere Biopsie sowie bei Tumoren die größer als 4 cm sind eine zentrale und zwei periphere Biopsien erfolgen, da die Wahrscheinlichkeit der Tumornekrose im Tumorzentrum größer ist.

Der Zelltyp und das Grading waren in verschiedenen Tumorarealen sowohl in der Peripherie als auch im Tumorzentrum identisch. In einigen Biopsien konnte zwischen klarzelligen und chromophoben Tumorstrukturen nicht unterschieden werden.

Das Wachstumsverhalten war in vielen Tumorbiopsien nicht immer zu erkennen, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen hohen Anteil nekrotischer Areale zurückzuführen ist.

In mehreren Biopsien wurde kein Tumormaterial gefunden, obwohl die Biopsien unter Sicht von den Tumoren entnommen wurden. Hier lässt sich vermuten, dass zu wenig Tumormaterial in den entnommenen Biopsien war, oder die Biopsien aus nekrotischen Tumoranteilen oder aus zystischen Tumorstrukturen oder aus Nierengewebe entnommen wurden.

6.2. Genetische Ergebnisse

Nach der pathohistologischen Auswertung der Biopsien erfolgte der Vergleich dieser Ergebnisse mit den pathohistologischen Diagnosen des Gesamttumors. In 100 von 250 Fällen stimmten die histologischen Befunde nicht überein und eine genetische Überprüfung wurde angeschlossen. Zur genetischen Charakterisierung dieser Fälle wurde die Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH) durchgeführt.

Die Chromosomenanalyse wurde an 100 Biopsien durchgeführt. Hier wurden 20 Tumore (14x klarzelliges NZK, 3x chromophiles NZK, 2x chromophobes NZK und 1x Onkozytom) untersucht. Aus jedem Tumor wurden 5 Biopsien entnommen und genetisch analysiert.

Junker et al. berichtet über eine mögliche genetische Charakterisierung in 93%. Hier wurden 174 Tumoren analysiert (Junker, Weirich et al. 2003).

In den zentral entnommenen Biopsien konnte die Malignität des Tumors in 65% der Biopsien (13/20 Biopsien) erkannt werden, in 35% konnten keine Chromosomenaberrationen festgestellt werden. Anders war es in den peripheren Biopsien, hier konnte die Malignität in 75% der Biopsien (15/20 Biopsien) evaluiert werden, in 25% waren keine chromosomalen Veränderungen festzustellen.

Unter Einbeziehung von 2 Biopsien von jedem Tumor erhöht sich die Genauigkeit der Chromosomenanalyse bezüglich der Tumorbilogie auf 85% (17/20 Biopsien).

6.2.1. Chromosomenaberrationen bei unterschiedlichen Zelltypen

6.2.1.1 Klarzellige NZK

In 70 der untersuchten klarzelligen Tumorbiopsien (von 100) wurden 45 Übereinstimmungen und 25 Diskrepanzen gefunden. Die strukturellen Alterationen stellten sich als Deletionen des gesamten Chromosoms dar. Kovacs berichtet, dass eine Deletion der -3p-Region in 98% der konventionellen NZK vorkommt (Kovacs 1999). In der vorliegenden Untersuchung traten solche Veränderungen am Chromosom 3 in 73% auf. Dies waren strukturelle Veränderungen im kurzen Arm im Bereich 3p14 und 3p21 bzw. Monosomien. Eine Häufung der Bruchpunkte im Bereich 3p14 und 3p21 lässt schlussfolgern, dass sich hier Gene befinden, die wesentlich an der Tumorgenese der NZK beteiligt sind (van den Berg, Dijkhuizen et al. 1997; Gronwald, Störkel et al. 1997; Sukosd, Kuroda et al. 2003). Weil es sich hier um den Verlust von genetischem Material handelt, lässt sich vermuten, dass Tumorsuppressorgene beteiligt sind, die bei Verlust der Heterozygotie inaktiviert werden (Knudson 1971; Decker, Neuhaus et al. 1996).

Weiterhin traten der Verlust des Chromosoms 14 bzw. Deletionen im Bereich 14q22qter auf (25%). Verluste des Chromosoms 14 oder Deletionen im längeren Arm dieses Chromosoms wurden auch durch andere Arbeitsgruppen beobachtet (Junker, Weirich et al. 2003, Yang, Yoshida et al. 2000).

Tri- und Tetrasomie des Chromosoms 7 waren ein weiterer häufiger Befund (48%). Die Rolle dieser Veränderung als spezifische Chromosomenaberration ist umstritten (Emanuel, Szucs et al. 1992). Die Trisomie auf dem Chromosom 7 wurde in anderen Tumoren gefunden z. B. in chromophilen NZK.

Am Chromosom 5 wurden häufig strukturelle Veränderungen im Sinne einer partiellen Trisomie 5q21qter sowie Tri- und Tetrasomie des gesamten Chromosoms 5 gefunden (28%). Molekulargenetische Untersuchungen bestätigen, dass die partielle Trisomie im Bereich 5q21qter charakteristisch für klarzellige NZK ist (Junker, Weirich et al. 2003; Yang, Yoshida et al. 2000). Im Weiteren waren wiederum Verluste der Chromosome 6, 8, 9 und Y nachweisbar. Es wird festgestellt, dass der Verlust der Chromosomen 8 und 9 mit der Tumorprogression in Zusammenhang stehen. Diese Chromosomenaberrationen werden

nur bei G2- und G3-Tumoren des Klarzelltyps beobachtet (Maloney, Norman et al. 1991; Kovacs 1993). In dieser Arbeit fanden wir den Verlust am Chromosom 8 ausschließlich in den G2-Tumoren.

In einem Tumor waren in allen 5 Biopsien typische Veränderungen für chromophobe NZK. Diese waren Verluste an den Chromosomen 1, 6, 10, 17. Der Pathologe stellte hier auch in den Biopsien ein chromophobes NZK fest. Die histologische Diagnose des Gesamttumors lautete klarzelliges NZK. Aufgrund der Malignität des genetischen Befundes wäre jedoch auch hier eine operative Intervention notwendig gewesen.

In einzelnen Fällen wurden unterschiedliche Veränderungen beobachtet, die in der Literatur nicht beschrieben sind, wie z. B. Zugewinne an den Chromosomen 2, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15 und 17. Diese wurden bei der Auswertung aufgrund ihrer Rarität nicht berücksichtigt.

6.2.1.2. Chromophile NZK

Bei 11 der 15 untersuchten Biopsien chromophiler Nierenzellkarzinome konnten chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden. Hier fanden sich Zugewinne der Chromosomen 7, 8 sowie 5q und 17q. Außerdem traten unterschiedliche Veränderungen auf, wie Zugewinn am Chromosom 9 und 11, sowie Verlust am Chromosom 1, 6, 10, 17 und 21. Diese Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Presti et al. beobachtete Zugewinne an den Chromosomen 7, 12 und 17 (Presti, Moch et al. 1998).

Jiang et al. berichteten über Zugewinne an folgenden Chromosomen: 7, 12, 16, 17 und 20, sowie über Verluste an den Chromosomen: 1, 4, 6, 9, 13 und Y (Jiang, Richter et al. 1998). Diese Veränderungen sind für papilläre NZK charakteristisch, da das papilläre Wachsmuster häufig mit dem chromophilen Zelltyp übereinstimmt. Laut Kovacs stellten die häufigsten Alterationen Zugewinne der Chromosomen 7, und 17 sowie den Verlust des Y Chromosoms bei männlichen Patienten dar. Bei fortgeschrittenen Tumoren finden sich Zugewinne der Chromosomen 3, 12, 16 und 20 (Kovacs 1999; Kovacs 1989). Die Verluste an den Chromosomen 10, 17 und 21 sind in der Literatur nicht beschrieben und sind als nicht spezifisch anzunehmen.

In allen 5 Biopsiepräparaten eines Tumors fanden sich Verluste an den Chromosomen 1, 10, 17 und 21. Zugewinne waren aber nicht feststellbar, so dass man davon ausgehen könnte, dass es sich hier um ein chromophobes NZK handelt. Die pathohistologische

Diagnose ergab jedoch ein chromophiles NZK. Für das therapeutische Vorgehen wäre das nicht relevant, da die Malignität des Tumors erkannt wurde.

In 5 Tumorbiopsien fand sich eine Übereinstimmung mit der histologischen Diagnose.

6.2.1.3. Chromophobe NZK

Bei 3 der 10 untersuchten chromophoben Nierentumorbiopsien fand sich hauptsächlich eine Monosomie am Chromosom 17 sowie am Chromosom 8p. Speicher et al. (1994) berichteten über den Verlust am Chromosom 17 in 13 von 17 Fällen. Über Verluste an den Chromosomen 2, 10 und 13 wurde ebenfalls berichtet. In 75-100 % der chromophoben Nierenzellkarzinome sind die Kombination von spezifischen Chromosomenalterationen in Form von Monosomien der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 charakteristisch, so Kovacs 1999 (Kovacs 1999; Schwerdtle, Störkel et al. 1996; Gunawan, Bergmann et al. 1999).

Junker et al. berichtete ebenso über die Verluste an den Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21. Speicher et al. berichtete ebenso über Verluste an den Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 (Speicher, Schoell et al. 1994). Diese Veränderungen konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Zugewinne gab es am Chromosom 4q und 5q. Allerdings wurde in der Literatur über Zugewinne in den chromophoben NZK nicht berichtet, so dass man davon ausgehen muss, dass es sich nicht um spezifische Veränderungen handelt. In den anderen 7 untersuchten Präparaten waren keine chromosomalen Veränderungen zu verzeichnen, in diesen Biopsiepräparaten war eine pathohistologische Diagnose nicht möglich.

Hier war in 2 Tumorbiopsien eine Übereinstimmung mit der histologischen Diagnose festzustellen.

6.2.1.4. Onkozytome

In 4 von den 5 untersuchten Nierentumorbiopsien von Onkozytomtyp waren Zugewinne am Chromosom 11, 7q sowie Verlust am Chromosom 20q und 16. In einer Biopsie war keine Veränderung zu erkennen. Ein Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur ist erschwert, da die aufgetretenen strukturellen Veränderungen in der Literatur nicht beschrieben sind und die Anzahl der untersuchten Onkozytome gering ist (Walter, Pennington et al. 1989; Dijkhuizen, van den Berg et al. 1997; Junker, Weirich et al. 2001).

Kovacs beschrieb folgende spezifische Veränderungen für die Onkozytome: eine Gruppe der Nierenonkozytome zeigt eine Monosomie des Chromosoms 1 und/oder Chromosoms 14q sowie den Verlust des Y Chromosoms. Eine zweite Gruppe zeigt eine balancierte Translokation zwischen Chromosom 11q13 und anderen Chromosomen. Eine dritte Gruppe weist keine sichtbaren genetischen Alterationen auf oder zeigt unspezifische Veränderungen. (Kovacs 1999). Durch die in dieser Studie festgestellten strukturellen Veränderungen konnte man davon ausgehen, dass es sich hier nicht um einen malignen Tumor handelt.

6.2.2. Differenzierung der Chromosomenaberrationen nach Malignitätsgrad

Der Verlust des Chromosoms 14 bzw. Deletionen am langen Arm dieses Chromosoms konnten bei einem höheren Anteil der klarzelligen Tumoren mit einem Malignitätsgrad 2 als mit einem Malignitätsgrad 1 festgestellt werden. In dieser Arbeit wurden Tumoren mit Malignitätsgrad 3 nicht untersucht. Kovacs und andere Arbeitsgruppen vermuten, dass hier Gene für die hohe Malignität verantwortlich sind (Kovacs 1994). Außerdem wird weiterhin festgestellt, dass auch der Verlust der Chromosomen 8 und 9 ein Hinweis für die Tumorprogression ist, da diese Chromosomenaberrationen nur bei G2- und G3-Tumoren des klarzelligen NZK beobachtet wurden (Maloney, Norman et al. 1991; Kovacs 1993; Kovacs 1994). In dieser Arbeit fanden wir den Verlust am Chromosom 8 und ausschließlich in den G2-Tumoren. Der Verlust am Chromosom wurde auch vereinzelt bei G1-Tumoren dieses Zelltypes gefunden. Der häufige Verlust am Chromosom 17 bei G2-Tumoren als Hinweis für die Tumorprogression kann laut Literatur nicht bestätigt werden.

7- Schlussfolgerungen

Trotz fortgeschrittener Diagnostikmethoden ist die Dignität insbesondere von kleinen Raumforderungen der Niere nicht immer sicher abzuklären. Daher könnte die präoperative Feinnadelbiopsie zur Differenzialdiagnostik beitragen. Das Ziel dieser Studie ist deshalb die Bewertung der Aussagekraft der Feinnadelbiopsie. Hierzu erfolgte die pathohistologische und genetische Klassifizierung der gewonnenen Biopsien.

Ziel der pathohistologischen Untersuchung war es, die Auswertung der diagnostischen Sicherheit der Feinnadelbiopsie der Nierentumoren, um diese präoperative Diagnostikmethode bei unklaren Fällen einzusetzen.

Dabei wurden aus 50 Tumoren 250 Biopsien entnommen und von einem Pathologen auf der Basis klassischer pathologischen Untersuchungstechniken evaluiert.

Anhand der vorgelegten Ergebnisse konnte bewiesen werden, dass durch eine zentrale und eine periphere Biopsie, die Dignität bei Tumoren bis 4 cm im Durchmesser zu 96% identifiziert wird. Bei größeren Tumoren benötigten wir drei Biopsien um die Dignität zu 95% zu sichern. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die präoperative Feinnadelbiopsie verschiedener Nierentumoren eine sehr zuverlässige Diagnostikmethode ist.

In der Urologischen Klinik der FSU Jena wird deshalb dieses Diagnostikverfahren bei ausgewählten Indikationen praktiziert.

Ziel der genetischen Untersuchung war es, eine Differenzierung zwischen malignen und benignen Tumoren vornehmen zu können. Außerdem sollten spezifische Chromosomenaberrationen unterschiedlicher Subtypen der Nierenzellkarzinome und die Differenzierung nach Malignitätsgrad am Biopsiematerial festgestellt werden.

Methodisch fand die Vergleichende Genomische Hybridisierung Anwendung.

Die Chromosomenanalyse wurde an 100 Biopsien durchgeführt. Hier wurden 20 Tumore (14x klarzelliges NZK, 3x chromophiles NZK, 2x chromophobes NZK und 1x Onkozytom) untersucht.

Anhand der genetischen Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass von jedem Tumor eine zentrale und eine periphere Biopsie notwendig sind, um eine zuverlässige genetische Evaluierung durchführen zu können.

Unter optimalen Bedingungen kann die Analyse eines Tumors etwa eine Woche dauern. Außerdem sind die Kosten für eine genetische Analyse noch relativ hoch, so dass diese Methode zunächst auf ausgewählte Indikationen beschränkt bleibt.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die präoperative Feinnadelbiopsie der Nierentumoren zur pathohistologischen Evaluierung ein zuverlässiges und unkompliziertes Diagnostikverfahren ist, welches bei unklarem Ergebnis durch die genetische Analyse erweitert werden kann.

8- Literaturverzeichnis

- Abe, M. and M. Saitoh (1992). "Selective renal tumour biopsy under ultrasonic guidance." Br J Urol **70**(1): 7-11.
- Asal, N. R., J. R. Geyer, et al. (1988). "Risk factors in renal cell carcinoma. II. Medical history, occupation, multivariate analysis, and conclusions." Cancer Detect Prev **13**(3-4): 263-79.
- Asal, N. R., D. R. Risser, et al. (1988). "Risk factors in renal cell carcinoma: I. Methodology, demographics, tobacco, beverage use, and obesity." Cancer Detect Prev **11**(3-6): 359-77.
- Auperin, A., S. Benhamou, et al. (1994). "Occupational risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study." Occup Environ Med **51**(6): 426-8.
- Benhamou, S., M. H. Lenfant, et al. (1993). "Risk factors for renal-cell carcinoma in a French case-control study." Int J Cancer **55**(1): 32-6.
- Bolzer, A., J. M. Craig, et al. (1999). "A complete set of repeat-depleted, PCR-amplifiable, human chromosome-specific painting probes." Cytogenet Cell Genet **84**(3-4): 233-40.
- Bornfleth, H., K. Aldinger, et al. (1996). "Comparative genomic hybridization imaging by the one-chip true-color CCD camera kappa CF 15 MC." Cytometry **24**(1): 1-13.
- Brauch, H., G. Weirich, et al. (2000). "VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation." Cancer Res **60**(7): 1942-8.
- Caoili, E. M., R. O. Bude, et al. (2002). "Evaluation of sonographically guided percutaneous core biopsy of renal masses." AJR Am J Roentgenol **179**(2): 373-8.
- Cheville, J. C., C. M. Lohse, et al. (2003). "Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma." Am J Surg Pathol **27**(5): 612-24.
- Chow, W. H., J. K. McLaughlin, et al. (1996). "Obesity and risk of renal cell cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **5**(1): 17-21.
- Christensen, J., S. Lindequist, et al. (1995). "Ultrasound-guided renal biopsy with biopsy gun technique--efficacy and complications." Acta Radiol **36**(3): 276-9.
- Decker, H. J. (2002). "Nierenzellkarzinome."

- Decker, H. J., C. Neuhaus, et al. (1996). "Detection of a germline mutation and somatic homozygous loss of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene in a family with a de novo mutation. A combined genetic study, including cytogenetics, PCR/SSCP, FISH, and CGH." Hum Genet **97**(6): 770-6.
- Desai, M. M. and I. S. Gill (2002). "Current status of cryoablation and radiofrequency ablation in the management of renal tumors." Curr Opin Urol **12**(5): 387-93.
- Dhote, R., M. Pellicer-Coeuret, et al. (2000). "Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention." BJU Int **86**(1): 20-7.
- Dijkhuizen, T., E. van den Berg, et al. (1997). "Renal oncocytoma with t(5;12;11), der(1)1;8) and add(19): "true" oncocytoma or chromophobe adenoma?" Int J Cancer **73**(4): 521-4.
- du Manoir, S., O. P. Kallioniemi, et al. (1995). "Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization." Cytometry **19**(1): 4-9.
- Emanuel, A., S. Szucs, et al. (1992). "Clonal aberrations of chromosomes X, Y, 7 and 10 in normal kidney tissue of patients with renal cell tumors." Genes Chromosomes Cancer **4**(1): 75-7.
- Fischer, C. G. (1999). "[Etiology, pathogenesis and therapy of renal cell carcinoma]." Radiologe **39**(5): 343-9.
- Gettman, M. T. and M. L. Blute (2002). "Update on pathologic staging of renal cell carcinoma." Urology **60**(2): 209-17.
- Gill, I. S., A. C. Novick, et al. (1998). "Laparoscopic renal cryoablation: initial clinical series." Urology **52**(4): 543-51.
- Gronwald, J., S. Storkel, et al. (1997). "Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events." Cancer Res **57**(3): 481-7.
- Gunawan, B., F. Bergmann, et al. (1999). "Polyploidization and losses of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, and 17 in three cases of chromophobe renal cell carcinomas." Cancer Genet Cytogenet **110**(1): 57-61.
- Gunia, S., M. May, et al. (2004). "[Renal cell carcinoma. Comparative analysis of the prognostic significance of the WHO-classification and the Storkel's prognostic score]." Urologe A **43**(4): 450-6.
- Handa, K. and N. Kreiger (2002). "Diet patterns and the risk of renal cell carcinoma." Public Health Nutr **5**(6): 757-67.

- Hara, I., H. Miyake, et al. (2001). "Role of percutaneous image-guided biopsy in the evaluation of renal masses." Urol Int **67**(3): 199-202.
- Harada, T., K. Shiraishi, et al. (2000). "Evaluation of the reliability of chromosomal imbalances detected by combined use of universal DNA amplification and comparative genomic hybridization." Jpn J Cancer Res **91**(11): 1119-25.
- Heidenreich, A. and V. Ravery (2004). "Preoperative imaging in renal cell cancer." World J Urol **22**(5): 307-15.
- Hergesell, O., H. Felten, et al. (1998). "Safety of ultrasound-guided percutaneous renal biopsy-retrospective analysis of 1090 consecutive cases." Nephrol Dial Transplant **13**(4): 975-7.
- Herts, B. R. and M. E. Baker (1995). "The current role of percutaneous biopsy in the evaluation of renal masses." Semin Urol Oncol **13**(4): 254-61.
- Hirose, Y., K. Aldape, et al. (2001). "Tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) is an effective method to analyze genetic aberrations in invasive tumors." J Mol Diagn **3**(2): 62-7.
- Hsu, T. H., M. E. Fidler, et al. (2000). "Radiofrequency ablation of the kidney: acute and chronic histology in porcine model." Urology **56**(5): 872-5.
- Jiang, F., J. Richter, et al. (1998). "Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes." Am J Pathol **153**(5): 1467-73.
- Johnson, P. T., L. N. Nazarian, et al. (2001). "Sonographically guided renal mass biopsy: indications and efficacy." J Ultrasound Med **20**(7): 749-53; quiz 755.
- Junker, K., G. Weirich, et al. (2003). "Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization." Recent Results Cancer Res **162**: 169-75.
- Junker, K., G. Weirich, et al. (2001). "Familial and sporadic renal oncocytomas--a comparative molecular-genetic analysis." Eur Urol **40**(3): 330-6.
- Kallioniemi, O. P., A. Kallioniemi, et al. (1994). "Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors." Genes Chromosomes Cancer **10**(4): 231-43.
- Kallioniemi, O. P., A. Kallioniemi, et al. (1993). "Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors." Semin Cancer Biol **4**(1): 41-6.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.

- Kolb, L. G., J. A. Velosa, et al. (1994). "Percutaneous renal allograft biopsy. A comparison of two needle types and analysis of risk factors." Transplantation **57**(12): 1742-6.
- Kovacs, G. (1989). "Papillary renal cell carcinoma. A morphologic and cytogenetic study of 11 cases." Am J Pathol **134**(1): 27-34.
- Kovacs, G. (1993). "Molecular cytogenetics of renal cell tumors." Adv Cancer Res **62**: 89-124.
- Kovacs, G. (1993). "Molecular differential pathology of renal cell tumours." Histopathology **22**(1): 1-8.
- Kovacs, G. (1994). "The value of molecular genetic analysis in the diagnosis and prognosis of renal cell tumours." World J Urol **12**(2): 64-8.
- Kovacs, G. (1999). "[Molecular genetics and diagnosis of renal cell tumors]." Urologe A **38**(5): 433-41.
- Kovacs, G., M. Akhtar, et al. (1997). "The Heidelberg classification of renal cell tumours." J Pathol **183**(2): 131-3.
- Kuukasjarvi, T., M. Tanner, et al. (1997). "Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization." Genes Chromosomes Cancer **18**(2): 94-101.
- Lage, J. M., J. H. Leamon, et al. (2003). "Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH." Genome Res **13**(2): 294-307.
- Latif, F., K. Tory, et al. (1993). "Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene." Science **260**(5112): 1317-20.
- Lechevallier, E., M. Andre, et al. (2000). "Fine-needle percutaneous biopsy of renal masses with helical CT guidance." Radiology **216**(2): 506-10.
- Linehan, W. M., J. R. Gnarra, et al. (1993). "Genetic basis of renal cell cancer." Important Adv Oncol: 47-70.
- Linehan, W. M., M. M. Walther, et al. (2003). "The genetic basis of cancer of the kidney." J Urol **170**(6 Pt 1): 2163-72.
- Maher, E. R., L. Iselius, et al. (1991). "Von Hippel-Lindau disease: a genetic study." J Med Genet **28**(7): 443-7.
- Maher, E. R. and J. R. Yates (1991). "Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects." Br J Cancer **63**(2): 176-9.
- Maloney, K. E., R. W. Norman, et al. (1991). "Cytogenetic abnormalities associated with renal cell carcinoma." J Urol **146**(3): 692-6.

- Mullis, K. B. (1990). "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." Ann Biol Clin (Paris) **48**(8): 579-82.
- Mullis, K. B. (1991). "The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion." PCR Methods Appl **1**(1): 1-4.
- Nadel, L., B. R. Baumgartner, et al. (1986). "Percutaneous renal biopsies: accuracy, safety, and indications." Urol Radiol **8**(2): 67-71.
- Neuzillet, Y., E. Lechevallier, et al. (2004). "Accuracy and clinical role of fine needle percutaneous biopsy with computerized tomography guidance of small (less than 4.0 cm) renal masses." J Urol **171**(5): 1802-5.
- Ohmori, H., K. Arimoto, et al. (1990). "[A new automated renal biopsy technique under ultrasound guidance]." Nippon Jinzo Gakkai Shi **32**(4): 409-14.
- Pack, S. D., B. Zbar, et al. (1999). "Constitutional von Hippel-Lindau (VHL) gene deletions detected in VHL families by fluorescence in situ hybridization." Cancer Res **59**(21): 5560-4.
- Petersen, I., A. Schwendel, et al. (1996). "[Comparative genomic hybridization. A screening method in genetic tumor diagnosis]." Pathologie **17**(5): 333-41.
- Phillips, J. L., B. M. Ghadimi, et al. (2001). "Molecular cytogenetic characterization of early and late renal cell carcinomas in von Hippel-Lindau disease." Genes Chromosomes Cancer **31**(1): 1-9.
- Phillips, J. L., C. P. Pavlovich, et al. (2001). "The genetic basis of renal epithelial tumors: advances in research and its impact on prognosis and therapy." Curr Opin Urol **11**(5): 463-9.
- Preda, A., L. C. Van Dijk, et al. (2003). "Complication rate and diagnostic yield of 515 consecutive ultrasound-guided biopsies of renal allografts and native kidneys using a 14-gauge Biopty gun." Eur Radiol **13**(3): 527-30.
- Presti, J. C., Jr., H. Moch, et al. (1998). "Initiating genetic events in small renal neoplasms detected by comparative genomic hybridization." J Urol **160**(4): 1557-61.
- Reddan, D. N., G. V. Raj, et al. (2001). "Management of small renal tumors: an overview." Am J Med **110**(7): 558-62.
- Rendon, R. A., J. R. Kachura, et al. (2002). "The uncertainty of radio frequency treatment of renal cell carcinoma: findings at immediate and delayed nephrectomy." J Urol **167**(4): 1587-92.

- Roth, K., G. Wolf, et al. (1996). "[Analysis program for quantitative detection of chromosome aberrations using comparative genomic hybridization]." Pathologe **17**(5): 342-8.
- Sachse (1994). "Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-kettenreaktion."
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Schlichter, A., H. Wunderlich, et al. (1999). "[Limits for organ-preserving surgery in renal cell carcinoma]." Urologe A **38**(5): 479-85.
- Schwerdtle, R. F., S. Storkel, et al. (1996). "Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma." Cancer Res **56**(13): 2927-30.
- Sewell, P. E., J. C. Howard, et al. (2003). "Interventional magnetic resonance image-guided percutaneous cryoablation of renal tumors." South Med J **96**(7): 708-10.
- Smith, E. H. (1991). "Complications of percutaneous abdominal fine-needle biopsy. Review." Radiology **178**(1): 253-8.
- Speicher, M. R., B. Schoell, et al. (1994). "Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization." Am J Pathol **145**(2): 356-64.
- Stetler, D., H. Das, et al. (1982). "Isolation of a cDNA clone for the human HLA-DR antigen alpha chain by using a synthetic oligonucleotide as a hybridization probe." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(19): 5966-70.
- Störkel, S. (1999). "[Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation]." Urologe A **38**(5): 425-32.
- Störkel, S., J. N. Eble, et al. (1997). "Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC)." Cancer **80**(5): 987-9.
- Störkel, S., R. Simon, et al. (1996). "[Comparative genomic hybridization in pathology. A new molecular cytogenetic method]." Pathologe **17**(3): 189-94.
- Sukosd, F., N. Kuroda, et al. (2003). "Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma." Cancer Res **63**(2): 455-7.
- Syrjanen, K. and L. Hjelt (1978). "Grading of human renal adenocarcinoma." Scand J Urol Nephrol **12**(1): 49-55.

- Talamini, R., A. E. Baron, et al. (1990). "A case-control study of risk factor for renal cell cancer in northern Italy." Cancer Causes Control **1**(2): 125-31.
- Thoenes, W., S. Storkel, et al. (1986). "Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics." Pathol Res Pract **181**(2): 125-43.
- van den Berg, E., T. Dijkhuizen, et al. (1997). "Cytogenetic classification of renal cell cancer." Cancer Genet Cytogenet **95**(1): 103-7.
- Van Poppel, H. (2003). "Partial nephrectomy: the standard approach for small renal cell carcinoma?" Curr Opin Urol **13**(6): 431-2.
- Walter, T. A., R. D. Pennington, et al. (1989). "Translocation t(9;11)(p23;q12): a primary chromosomal change in renal oncocytoma." J Urol **142**(1): 117-9.
- Warshauer, D. M., S. M. McCarthy, et al. (1988). "Detection of renal masses: sensitivities and specificities of excretory urography/linear tomography, US, and CT." Radiology **169**(2): 363-5.
- Weiss, M. M., M. A. Hermsen, et al. (1999). "Comparative genomic hybridisation." Mol Pathol **52**(5): 243-51.
- Wood, B. J., M. A. Khan, et al. (1999). "Imaging guided biopsy of renal masses: indications, accuracy and impact on clinical management." J Urol **161**(5): 1470-4.
- Wunderlich, H., M. Dreihaupt, et al. (2004). "New cut-off point between T1 and T2 renal cell carcinoma - necessary for a better discriminatory power of the TNM classification." Urol Int **72**(2): 123-8.
- Wunderlich, H., O. Reichelt, et al. (1998). "Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma 4 cm. or less in diameter: indicated or under treated?" J Urol **159**(5): 1465-9.
- Yang, Z. Q., M. A. Yoshida, et al. (2000). "Molecular cytogenetic analysis of 17 renal cancer cell lines: increased copy number at 5q31-33 in cell lines from nonpapillary carcinomas." Jpn J Cancer Res **91**(2): 156-63.
- Yu, M. C., T. M. Mack, et al. (1986). "Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma." J Natl Cancer Inst **77**(2): 351-6.
- Zbar, B., W. Kaelin, et al. (1999). "Third International Meeting on von Hippel-Lindau disease." Cancer Res **59**(9): 2251-3.
- Ziegler (1991). Die Pathologie der benignen und malignen Nierenzelltumoren.

Zlotta, A. R., T. Wildschutz, et al. (1997). "Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer: ex vivo and in vivo experience." J Endourol **11**(4): 251-8.

9. ANHANG;

I-Tabellen

Tab.12: Vergleich der pathohistologischen Ergebnisse in den Biopsien und in dem Op-Präparat

Biopsien-Nummer	1	2	3	4	5	Histologie
1-	klarzellig, G2	Fibrose	Fibrose	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2. Fibrose	klarzellig, pT1, G2
2-	Fibrose, kein Tumor	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G2. Nekrose	Fibrose, kein Tumor	klarzellig, G2. Fibrose	klarzellig, pT2, G2
3-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G1. Nieren-parenchym	klarzellig, kompakt, G1	klarzellig, kompakt, G1	klarzellig, kompakt, G1	klarzellig, pT1, G2
4-	klarzellig, kompakt, G2. Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	klarzellig, kompakt, G2. Fibrose	Nieren-parenchym	klarzellig, G2. Nieren-parenchym	klarzellig, pT1
5-	klarzellig, G2. Nekrose, Fibrose	Nekrose, Fibrose	klarzellig, G2. Nekrose	Nekrose	klarzellig, eosinophil, papillär	klarzellig, pT3, G2
6-	klarzellig	klarzellig	klarzellig	kein Tumor	kein Tumor	klarzellig
7-	klarzellig, G1	klarzellig, G1	Nieren-parenchym	klarzellig, G1	Nieren-parenchym	klarzellig, kompakt, G1
8-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	Nieren-parenchym	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G2
9-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, eosinophil, G2	klarzellig, eosinophil, G2	klarzellig	klarzellig	klarzellig, G2
10-	papillär-zystischer Tumor	Fibrose	klarzellig, zystisch	klarzellig, zystisch	klarzellig, zystisch, G2	klarzellig, G2

Biopsie- Nummer	1	2	3	4	5	Histologie
11-	klarzellig, eosinophil DD: chromophob, eosinophil	klarzellig, eosinophil DD: chromophob, eosinophil	klarzellig, eosinophil DD: chromophob, eosinophil	Nekrose	klarzellig, Nieren- parenchym	klarzellig, G2
12-	klarzellig, kompakt, G1. Fibrose	klarzellig, kompakt, G1	Fibrose. kein Tumor	kein Tumor	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, pT1, G2
13-	chromophob, eosinophil DD: klarzellig, eosinophil	Nekrose	chromophob eosinophil DD: klarzellig, eosinophil	chromophob eosinophil DD: klarzellig, eosinophil	chromophob eosinophil DD: klarzellig, eosinophil	klarzellig, G2
14-	chromophil, papillär, G2	chromophil, papillär, G1-G2	chromophil, papillär, G2,	chromophil, papillär, G2	chromophil, papillär, G2	papillärer Tumor, G2
15-	Nekrose	klarzellig, kompakt, G2-3	eosinophil, kompakt	klarzellig, eosinophil. Fibrose	Nekrose	klarzellig, G2
16-	Fibrose. kein Tumor	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G2	kein Tumor	Fibrose	klarzellig, G2
17-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, pT1, G1
18-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G1
19-	Fibrose	Fibrose	Nekrose	epithelialer Tumor	Nekrose	klarzellig, kompakt- zystisch, G2
20-	papillärer NB-Tumor, G2	papillärer NB-Tumor,	papillärer NB-Tumor,	papillärer NB-Tumor,	papillärer NB-Tumor,	chromophil, papillär

Biopsie-Nummer	1	2	3	4	5	Histologie
21-	klarzellig, G2	Nieren-parenchym	Fibrose	klarzellig, G2	klarzellig, G2	klarzellig, G2
22-	papilläres Nierenzell-karzinom	papilläres Nierenzell-karzinom	papilläres Nierenzell-karzinom	papilläres Nierenzell-karzinom	papilläres Nierenzell-karzinom	papilläres Nierenzell-karzinom
23-	Urothel, kein Karzinom	Urothel mit Atypien	Urothel-Ca G2-3	Fibrose, kein Tumor	papilläres Urothel-Ca G2-3	Urothel-Ca G2
24-	Nekrose	klarzellig, zystisch, G1. Fibrose	klarzellig, zystisch. Fibrose	klarzellig, zystisch. Fibrose, Nekrose	klarzellig, zystisch, G1. Fibrose,	klarzellig, kompakt-zystisch, G2
25-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	Nieren-parenchym	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2
26-	chromophob-eosinophil. Nekrose	klarzellig chromophob-eosinophil, G2	klarzellig. Nekrose	klarzellig, G2	chromophob-eosinophil	klarzellig, G2
27-	Nekrose, Fibrose, Entzündung	epithelialer Tumor, Nekrose	Nekrose, Entzündung	Nieren-parenchym	Nekrose, Entzündung	klarzellig, sarkomatoide Transformation
28-	Nekrose	klarzellig, eosinophil. Nekrose	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig	klarzellig, G2
29-	chromophob DD: klarzellig, eosinophil	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	chromophob DD: klarzellig eosinophil	Nieren-parenchym	chromophob
30-	klarzellig, kompakt, G2. Fibrose	klarzellig, zystisch, G2	Nieren-parenchym	klarzellig, zystisch, G2	klarzellig, zystisch, G2	klarzellig, pT1, G2

Biopsie-Nummer	1	2	3	4	5	Histologie
31-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2. Nekrose	Nekrose	klarzellig, pT3a
32-	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	klarzellig, G2
33-	chromophil, kompakt, G2	Fibrose	chromophil, G2	chromophil, G2	chromophil, G2	klarzellig, pT1, G2
34-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	chromophil-eosinophil, pT3
35-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, zystisch, G2	klarzellig, zystisch, G2	klarzellig, kompakt	klarzellig, kompakt, zystisch	chromophil, pT1, G2
36-	chromophil. Nekrose	Nekrose	papillärer Tumor	Urothel-Ca. Nekrose	Nekrose	chromophil-eosinophil, papillär
37-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2
38-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2
39-	Nekrose	kein Tumor	epithelialer Tumor	papillärer Tumor	epithelialer Tumor	klarzellig, kompakt, G2
40-	klarzellig, G2. Fibrose	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, zystisch, G2	klarzellig, kompakt, G2

Biopsie-Nummer	1	2	3	4	5	Histologie
41-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2. Fibrose	Fibrose	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, pT1, G2
42-	Onkozytom. Nieren-parenchym	Nieren-parenchym Fibrose	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym, Fibrose	Onkozytom
43-	Onkozytom	Onkozytom	Onkozytom	Onkozytom. Nieren-parenchym	Onkozytom	Onkozytom
44-	Nieren-parenchym. Fibrose	Fibrose	Nieren-parenchym	klarzellig, G2	klarzellig, G2	klarzellig, G1
45-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, pT1, G2
46-	chromophil, basophil, papillär, G2	chromophil, basophil, papillär, G2	chromophil, basophil, papillär, G2	chromophil, basophil, papillär, G2	chromophil, basophil, papillär, G2	chromophil, papillär, pT1, G2
47-	Onkozytom. Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	Wenig Material	Onkozytom DD: chromophob	Onkozytom
48-	Onkozytom	Onkozytom	Onkozytom	Onkozytom	Fibrose	Onkozytom
49-	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2. Fibrose	Fibrose	klarzellig, pT1, G1
50	klarzellig, G2	Nieren-parenchym	Nieren-parenchym	klarzellig, G2. Fibrose	Nieren-parenchym	chromophob kompakt, G2

Tab.13: Vergleich der pathohistologischen, histologischen und genetischen Ergebnisse

Tumor Nr.	Histologie		I	II	III	IV	V
1 12527	klarzellig mit sarkomatoider Transformationen	Histologie	Nekrose, Entzündung, Fibrose	epithelialer Tumor, Nekrose	Nekrose, Entzündung	Nekrose, Entzündung, Nierengewebe	Nekrose, Entzündung
		CGH	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung
2 14806	chromophil, pT1, G2	Histologie	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, zystisch	klarzellig, kompakt DD: chromophob	klarzellig, kompakt, zystisch DD: chromophob
		CGH	dim: 1,6,10, 17,21.	dim: 1,6,10, 17, 21.	dim: 17	dim: 1,6,10, 17,21	dim: 1,6,10 ,17,21
3 14539	klarzellig, pT1 G2	Histologie	chromophob, kompakt, G2	Fibrose	chromophob, G2	chromophob, G2	chromophob, G2
		CGH	dim: 6p,17 enh: 3,4,5,7,8, 9,11,12,14, 15	dim: 2p,6p,17 enh: 3,4,5,7,8, 9,11,12,14, 15	dim: 6p,10,17 enh: 3,4,5,8,9, 11, 12,14,15	dim: 6p,10,12. enh: 3,4,5,7,8q,9, 11,12,14,15	dim: 1,6p,17 enh: 3,4,5,7,8, 9,11,12
4 12385	klarzellig, G2	Histologie	chromophob, eosinophil, Nekrose	klarzellig, chromophob, G2	klarzellig, eosinophil. Nekrose	klarzellig, G2	chromophob, eosinophil
		CGH	dim: 3p	dim: 3p	dim: 3p	dim: 3p	Dim: 3p
5 17970	klarzellig, kompakt, G2	Histologie	Nekrose	Bindegewebe	epithelialer Tumor	papillärer Tumor DD: NB-Tumor	epithelialer Tumor. Nekrose
		CGH	keine Veränderung	dim: 3p,13p,6, 8p,14q21qter, 15q21qter enh: 3q,6q,8q12	dim: 3p,8p, 13pter,14qter, 15q21qter enh: 3q,8q, 12	dim: 3p, 13pter, 15q21qter enh: 3q,8q, 12	keine Veränderung
6 12796	klarzellig, G1	Histologie	chromophob, G1-2. Nierengewebe	chromophob, kompakt, G2	Nierengewebe	Nierenbecken	chromophob, G2
		CGH	keine Veränderung	dim: 3p	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung

7 8961	klarzellig, kompakt, zystisch. G2	Histologie	epithelialer Tumor. Fibrose	Fibrose	Nekrose	epithelialer Tumor	Nekrose
		CGH	dim: 14q22qter enh: 19, 2, 3p14qter,4q,5, 7,8q,13q	enh: 1q,2q, 3p14qter,4q,5, 7,8q,13q	enh: 1q,2q, 3p14qter,5,7, 8q,13q	dim: 3p14pter 14q22qter enh:1q,2q, 3p14qter,4q,5, 7,13q	enh: 1q,3p14qter,5, 13q
8 9552	chromophil, papillär	Histologie	NB-Tumor, papillär G2	NB-Tumor, papillär	NB-Tumor, papillär	NB-Tumor, papillär	NB-Tumor, papillär
		CGH	enh: 5q,6p,7?,8q,9, 11	enh: 6p,8q.	dim: 17p enh: 6p,7,8q,17q	dim: 17p enh: 6p,7,8,17q	enh: 6p,7,8?
9 5835	klarzellig, G2	Histologie	klarzellig, eosinophil DD: chromophob	klarzellig, eosinophil DD: chromophob	klarzellig, eosinophil DD: chromophob	klarzellig, eosinophil DD: chromophob	Klarzellig, eosinophil DD: chromophob
		CGH	dim: 3p14pter,17p enh: 7,12?, 14q22qter?	dim: Y. enh: 7,16.	dim: Y.	dim: Y.	dim: Y. enh: 7,8p,12,20.
10 21474	Onkozytom	Histologie	Onkozytom	Onkozytom	Onkozytom	Onkozytom	Fibrose
		CGH	enh: 11, 7q31qter	enh: 11,7q31qter9. dim: 20q	enh: 7q31qter,11	dim: 16 enh: 7q,11	keine Veränderung
11 3349	klarzellig, G2	Histologie	Chromophob, eosinophil DD: klarzellig, eosinophil	Nekrose. klarzellig, eosinophil DD: chromophob	Nekrose, klarzellig, eosinophil DD: chromophob	Nekrose	klarzellig, eosinophil Nierengewebe
		CGH	dim: 3p14p21,17p. enh: 2q,3q,4q,5,6q, 7,8q,12,15q	keine Veränderung	keine Veränderung	dim: 2q,3q,4q, 5p14q23,8q, 9p,12,13q enh: 1q,3p?,6p,17	keine Veränderung
12 23286	chromo- phob, kompakt, G2, pT1	Histologie	klarzellig, G2? Nekrose, Nierengewebe	Nierengewebe	klarzellig, eosinophil. Nierengewebe	klarzellig, G2? Fibrose	Fibrose, Nierengewebe
		CGH	dim: 8p,17. enh: 4q,5q	keine Veränderung	keine Veränderung	dim: 8p?, 9q22qter,17 enh: 4q,5q, 8q.	dim: 8p,17 enh: 4q,5,6q

13 13331	chromo- phob	Histologie	klarzellig, eosinophil DD: chromophob	Nierengewebe	Nierengewebe	klarzellig, eosinophil DD: chromophob	Nierengewebe
		CGH	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung
14 14672	chromophil, eosinophil, pT3	Histologie	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2. DD: chromophob	klarzellig, kompakt, G2.	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2 DD: chromophob
		CGH	keine Veränderung	dim: 16q enh: 5q.	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung
15 17627	klarzellig,G 2	Histologie	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2
		CGH	dim: 3p14pter enh: 2q?	dim: 17p, 3p14pter enh: 2q?	dim: 3p14pter enh: 2q?	dim: 3p14pter enh: 2q?	dim: 17p, 3p14pter enh: 2q?
16 11864	klarzellig, G2	Histologie	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	Nierengewebe	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2
		CGH	dim: 3p14pter, 16p enh: 7	dim: 3p14pter,16p enh: 7	dim: 3p14pter,16p enh: 7	dim: 3p14pter enh: 7	dim: 3p14pter enh: 7
17 2820	klarzellig, kompakt, G1	Histologie	klarzellig, G1	klarzellig, G1	Nierengewebe	klarzellig, G1	Nierengewebe
		CGH	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung	dim: 3p21pter enh: 5q21qter.	keine Veränderung
18 3033	klarzellig, G2	Histologie	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	Nierengewebe	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt. G2
		CGH	keine Veränderung	dim: 3p enh: 5q21qter.	keine Veränderung	dim: 3p, 7 enh: 5q21qter	keine Veränderung
19 8163	klarzellig, PT1, G1	Histologie	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, G1
		CGH	dim: 3p14p21 enh: 7	dim: 3p14p21 enh: 7	dim: 3p14p21 enh: 7	dim:3p14pter, 4p?,16p. enh: 7	dim: 3p14pter,16p enh:7
20 17685	klarzellig, G2	Histologie	klarzellig, kompakt. G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2	klarzellig, kompakt, G2
		CGH	dim: 3p,4p	dim: 3p,4p	dim:3p,4p, Y	dim: 3p,4p,Y	dim: 3p,4p?,Y

II- Lebenslauf

Name, Vorname: Al Mustafa Al Mohannad

Geburtsdatum: 16.09.1966

Geburtsort: Der Ezorr/Syrien

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Anschrift: Seidelstr. 10
07749 Jena

Schulbildung: 1972-1977 Grundschule in Damaskus (Syrien)
1977-1984 Gymnasium in Damaskus, Abschluss:
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung: 1984-1985 TU Damaskus, 2 Semester
1985-1986 Medizinische Hochschule Woronesch
(Russland), Vorbereitungsjahr Studiengang Medizin
1986-1992 Medizinische Hochschule Wolgograd
(Russland), Studiengang Medizin, Abschluss: Diplom
1992-1993 klinische Ordinatur Urologie (Russland)
1994 Sprachkurs Deutsch in Schleswig

Berufliche Ausbildung 1995-1996 AiP Damp Abteilung Gefäßchirurgie
1999-2000 Assistenzarzt Klinikum Fichtelgebirge
Marktredwitz Urologische Abteilung
200-2001 Kreiskrankenhaus Vohenstrauß Chirurgie
2001-2005 Friedrich-Schiller Universität Jena
Klinik für Urologie
2005 SRH Wald-Klinikum Gera Urologische Klinik

Jena, 01.02.2006

III-Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. habil. J. Schubert, Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Überlassung des Themas und die Unterstützung der Arbeit.

Herrn Oberarzt PD Dr. A. Schlichter, Herrn Oberarzt PD Dr. H. Wunderlich und Frau Oberärztin PD Dr. K. Junker, Leiterin des Forschungslabors der Urologischen Universitätsklinik Jena danke ich, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Dr. W. Hindermann und den Mitarbeitern des Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die unschätzbare fachliche Beratung.

Mein Dank gilt den medizinisch-technische Assistenten des Forschungslabors der Urologischen Klinik Jena für ihre hilfreiche Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

IV- Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. med. habil. J. Schubert, Herr Priv.-Doz. Dr. med. habil. A. Schlichter, Frau Priv.-Doz. Dr. med. habil. K. Junker, Herr Priv.-Doz. Dr. med. habil. H. Wunderlich, Herr Dr. med. W. Hindermann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 01.02.2006